

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504362

(43) 公表日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
G 0 1 N 27/447		0275-2 J	G 0 1 N 27/26	3 1 5 A
C 1 2 M 1/42		7417-4 B	C 1 2 M 1/42	
		0275-2 J	G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁)

(21) 出願番号 特願平7-501939  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)6月3日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)12月8日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 0 6 2 1 5  
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 2 9 7 0 7  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)12月22日  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 0 7 4 , 4 3 2  
 (32) 優先日 1993年6月8日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,  
 D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M  
 C , N L , P T , S E ) , C A , J P

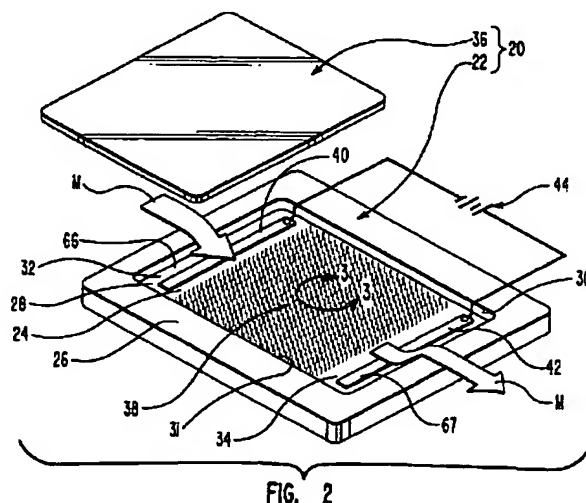
(71) 出願人 プリティッシュ・テクノロジー・グループ  
 プ・ユーエスエイ・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国ペンシルバニア州19406,  
 ガルフ・ミルズ, ルネサンス・ブルバード  
 2200  
 (72) 発明者 オースティン, ロバート・ハミルトン  
 アメリカ合衆国ニュージャージー州08540,  
 プリンストン, ハリス・ロード 135  
 (72) 発明者 ヴォルクマス, ウェイン・デーヴィッド  
 アメリカ合衆国ミネソタ州56301, セイン  
 ト・クラウド, レイク・ロード 25742  
 (74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 巨大分子及び細胞の分画用のマイクロログラフ配列

## (57) 【要約】

流体培地内の遊離細胞、ウィルス、巨大分子、又は微細粒子のような個々の微細構造体を分画し且つ同時に観察するための区分装置及び方法である。該区分装置 (20) は、その内部に配置された受容器 (24) を有する基層 (22) から成っており、該受容器 (24) は、側壁 (30、31) と、底部分 (28) とを備えている。妨害体 (38) の配列が受容器 (24) 内に配置されている。透明なカバー (36) が受容器 (38) の配列の上に位置して、受容器を覆い且つ妨害体を視覚的に観察することを可能にする。受容器内の流体培地内に電界を発生させ、微細構造体を移行させる電極 (40、42) を受容器 (24) 内に配置することが出来る。微細構造体の移行は、例えば、受容器に付与される流体力学、光学、磁力、重力の場により行わせることが出来る。妨害体配列の妨害体は、丸型ポスト、矩形バンカー又はV字形、或いはカップ状構造体のような各種の形状とすることが出来る。妨害体の配列は、所定の且つ再現可能なパターンにて形成し、また、再使用することが可能である。該装置を製造し且つ使用する方法もまた、請求の範



BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

1. 流体培地内の懸濁液中の微細構造体を区分する装置にして、該装置内で単一層として存在するように微細構造体を拘束する拘束手段と、前記微細構造体を該装置を通じて動かす作用のある電界又は同様の力の場を発生させる作用可能な場発生手段とを備えることを特徴とする装置。

2. 請求の範囲第1項に記載の装置にして、微細構造体が装置を通過して移動するとき、該微細構造体の経路内に位置して、これにより、該微細構造体の動作の一部を妨害する妨害体配列を備えることを特徴とする装置。

3. 請求の範囲第2項に記載の装置にして、前記妨害体が、方形、矩形、v字形、u字形（又はカップ状）或いはその他の適当な断面形状であり、若しくは、非直線状通路の開放した格子を形成する、相互に接続した細長のバンカーを備えることを特徴とする装置。

4. 請求の範囲第2項又は第3項に記載の装置にして、前記妨害体の高さ及び選択随意的に分離距離が、前記微細構造体の寸法に適合し、約0.01乃至50 $\mu$ mの範囲内にあることを特徴とする装置。

5. 請求の範囲第1項乃至第4項の何れかの項に記載の装置にして、該装置内の微細構造体の視覚的な検査を可能にする透明部分を備えることを特徴とする装置。

6. 請求の範囲第1項に記載の装置にして、流体培地中の細胞、ウィルス、巨大分子又は微細粒子のような微細構造体を区分する電気泳動装置を備え、

該電気泳動装置が、その一側部に配置された深さの浅い受容器を有する基層を備え、

前記受容器が、第一及び第二の端部と、前記受容器の前記第一及び第二の端部の間を伸長する一対の直立の対向側壁により、その両側部が画成される底部とを有し、

前記微細構造体が、前記受容器の前記第一の端部から前記受容器の前記第二の端部まで移行することにより、前記受容器に対する移行方向が画成され、

前記受容器の前記底部に対して直角に測定したときの前記側壁の高さが、前記受容器の深さを画成し、

該受容器の前記深さが、流体培地内の微細構造体の大きさに適合し、

これにより、前記微細構造体が流体培地内で前記受容器の前記第一の端部から前記受容器の前記第二の端部まで移行するとき、該微細構造体が、略単一層にて移行し、

前記第一及び第二の端部の中間にて、前記受容器内に配置された変位手段であって、前記移行方向と交差して、前記微細構造体と相互作用し、微細構造体が流体培地内で前記移行方向に移行するのを部分的に妨害する前記変位手段と、

前記変位手段の上方に配置された頂上手段であって、前記受容器を覆うと共に、前記微細構造体が前記受容器内で前記変位手段のみを通して略単一層にて移行するようにする、前記頂上手段と、

前記受容器の流体培地内に電界を発生させる電力手段とを備えることを特徴とする装置。

7. 流体培地内の遊離細胞、ウィルス、巨大分子又は微細粒子のような微細構造体を分画する請求の範囲第1項に記載の装置にして、その一側部に配置された深さの浅い受容器を有する基層を備え、

該受容器が、第一及び第二の端部と、前記受容器の前記第一及び第二の端部間を伸長する一対の直立の対向側壁により、その両側部が画成される底部分とを有し、

前記側壁の高さが、前記受容器の深さを画成し、

前記受容器の前記深さが、流体培地内の微細構造体の大きさに適合し、これにより、前記微細構造体が前記受容器の前記第一の端部から前記受容器の前記第二の端部まで移行するとき、該微細構造体が、略単一の層にて移行し、

その前記第一の端部と前記第二の端部との中間にて前記受容器の底部から直立する妨害体配列を備え、

該列の妨害体の各々が、所定の再現可能なパターンにて、前記配列内に配置され、前記対の直立の対向側壁の一方からその他方まで前記受容器を横断して伸長するカバースリップを備え、

該カバースリップが、前記基層と略等しい熱膨張率を有し、

前記カバースリップが、前記底部から遠方の前記妨害体の各々の端部に固着さ

れ、

前記受容器の流体培地内に電界を発生させ、これにより、帯電した微細構造体を励起して流体培地を通じて移行させる電力手段を備えることを特徴とする装置。

8. 流体培地内の懸濁液中の微細構造体を区分する方法にして、装置内に単一の層にて存在するように前記微細構造体を拘束する段階と、

電界又は同様の力の場を使用して、前記微細構造体を装置を通じて移動させる段階とを備えることを特徴とする方法。

9. 請求の範囲第 8 項に記載の方法にして、遊離細胞、ウィルス、巨大分子又は微小粒子のような微細構造体を電気泳動法により区分する請求の範囲第 8 項に記載の方法にして、

前記微細構造体を流体培地内に配置する段階と、

第一の端部と、第二の端部と、一对の直立の対向側壁により画成された底部分とを有する受容器であって、前記第一及び第二の端部の間にて、所定の且つ再現可能なパターンにて配置された直立の妨害体配列を有する前記受容器内に、その内部に微細構造体を有する流体培地を導入する段階と、を備え、

前記側壁の高さが、前記受容器の深さを画成し、

該受容器の該深さが、流体培地内の微細構造体の大きさに適合し、これにより、前記受容器内の流体培地内の微細構造体が前記妨害体配列を通して略単一層にて移行するようにし、

前記受容器の前記第一及び第二の端部の間にて流体培地内に電界を発生させる段階を備えることを特徴とする方法。

10. 流体培地内の懸濁液中の微細構造体を区分する装置を製造する方法にして、前記微細構造体の経路内に妨害体配列を提供し得るように適当な基層をフォトリソグラフ法によりエッチング処理する段階を備え、

該妨害体が、電界又は同様の力の場の影響の下、前記装置を通して移動する動きを部分的に妨害することを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 巨大分子及び細胞の分画用のマイクロソングラフ配列

本発明は、遊離細胞、ウィルス、巨大分子、又は微細粒子のような微細構造体を分画する装置及び方法に関する。特に、本発明は、好ましくは、その過程中、これらの微細構造体の各々を同時に観察する間に、液体培地中の懸濁した微細構造体を区分する装置及び方法に関する。

遊離細胞、ウィルス、巨大分子、又は微細粒子のような微細構造体の大きさの測定、分離及び研究は、分子生物学的において重要な研究手段である。例えば、この分画方法は、DNA分子に適用したとき、遺伝子の研究、及び最終的に遺伝子のエンジニアリング方法を計画し且つ実施する上に有用である。哺乳動物の細胞のような、より大きい微細構造体を分画することは、細胞生物学者に対し、生物のこうした基本的な形成ブロックの機能に関する新たな研究成果を生み出す機会を付与するものである。

巨大分子の分画に関しては、本発明の装置及び方法により、多くの種類の巨大分子を分画することが可能であるが、以下には、その一例として、DNA分子の分画について説明する。

複雑な有機体における単一の細胞内のDNA分子は、その細胞、及びその細胞が属する有機体を追試するために必要とされる全ての情報を含んでいる。DNA分子は、4つの異なる下部ユニットを二重らせん状鎖に形成されたものであり、そのユニットは、鎖に沿って遺伝子により暗号化された順序で生じる。これら4つの二重下部ユニットは、窒素含有基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンである。かかる分子の大きさは、その分子が含む基の数で判断される。自然のDNA分子は、長さ数千塩基対から長さ数百メガ塩基対の範囲に亘る。DNA分子の大きさは、その分子が含む遺伝子の数に略比例する。

また、DNA分子の大きさは、その分子量、その長さ、又はその分子が含む塩基数によって表すことも出来る。この塩基対の数が分かれば、その数をDNA分子の分子の長さ及び分子量に変換することが可能である。小DNA分子の大きさを推定する一つの方法は、ゲル電気泳動法である。

このゲル電気泳動法において、テングサゲル (agarose gel) を薄層の内で拡

散させ、また、硬化させて硬い組成物にする。組成物は、水のような液体培地を保持する微細繊維の回路網を有する。このテングサゲルの繊維は、互いに交差し且つ相互作用して、孔の格子を形成し、この孔よりも小さい分子は、その組成物に保持された液体内で移行する。この格子の孔の寸法は、全体として、使用されるゲルの濃度によって決まる。

ゲルが硬化した後に、ゲルの一端に穴を開けて、DNA分子をこの穴に入れる。次に、穴が形成された端部を反対側の端部に電源のプラス極側を入れることにより、典型的に  $1-10\text{ V/cm}$  の弱い電界が発生する。DNA電気泳動法において、DNAを含む穴が形成された組成物の端部にて、ゲル内に電源のマイナス極側を入れる。DNA分子は、マイナスに帯電されているため、電界により励起されて、ゲルを通して移行し、組成物の他端にて、電源のマイナス極に達する。これは、典型的に、僅か数  $\text{cm/時}$  の速度で行われる。

これら分子の電気泳動移動度は、定量化することが出来る。一つの分子の電気泳動移動度は、分子の速度と印加された電界の強さとの比である。自由溶液において、DNA分子の移動度は、その分子の長さ、又は印加された電界の大きさと無関係である。しかしながら、妨害された環境においては、その妨害された環境の構造体を別にして、分子の移動度は、その分子の長さ及び電界の強さの関数となる。

ゲル電気泳動法に使用されるゲルは、かかる妨害された環境を形成する。ゲル中の繊維により形成された格子構造体によりゲル内の液体培地を通じて移行する際に分子は、妨害される。しかしながら、電界により励起されれば、分子は、格子構造体の孔を通して移行することにより、ゲル内を移動する。より小さい分子は、より大きい分子よりもこれらの孔をより容易に、従って、より迅速に通ることが出来る。このため、より小さい分子は、より大きい分子よりも所定の時間内でゲル組成物を通して進む距離が長くなる。その結果、より小さい分子は、この過程でより大きい分子から分離される。このようにして、DNA分画が行われる。

ゲル電気泳動法は、DNA分画のための周知で且つ頻繁に使用される方法ではあるが、ゲル格子構造体における電気泳動移動度は、十分に解明されていない。

このため、この方法は、幾つかの性質上の制約がある。例えば、ゲルの格子の孔寸法は、正確に測定したり、表現することが出来ない。このため、格子を通して移行する分子の長さを正確に測定することは不可能である。また、長さが20メガ塩基対よりも大きいDNA分子は、ゲル中で正確に分画することは出来ない。勿論、かかる材料の格子の孔寸法は、より大きい分子、いわんや、より大きい粒子、ウィルス、又は遊離細胞を分画し得るように大きくすることは出来ない。

更に、ゲルが硬化するときに形成される格子構造体を予測することは不可能である。格子構造体が形成される形態、又はその孔の位置、寸法又は形状が決まる状態を予測することは出来ない。形成される格子の構造体は、その方法を実施する毎に異なったものとなる。このため、反復可能性を調整したり、その臨界的な科学的判断基準を設定することが出来ない。

その前のデータを予測可能に繰り返すためにゲル電気泳動法の実験を正確に再現することは出来ない。一回の実験で形成される格子構造体は正確に設定可能であるとしても、その構造体を再現することは出来ない。各実験は異なり、科学的方法は著しく遅い。

また、ゲルの格子構造体は、ゲルが自然に発生するものに限られる。孔の全体的な寸法は、ゲルの濃度を変えることにより、ある程度は制御可能であるが、孔の位置及び全体的な格子構造体を設定したり、設計することが出来ない。特定の目的に合うように構成した、特徴のある格子構造体をゲル中で形成することは出来ない。

更に、形成される格子構造体は、ゲルが硬化するときの条件に依存するため、単一組成の格子構造体であっても、必ずしも全体が均一であるとは限らない。ゲル電気泳動法のもう一つの欠点は、その格子構造体の孔と比較して、又は分画すべきDNA分子の大きさに対応して、比較的厚い層にしかゲルを配置出来ないことに起因する。このため、DNA分子は、幾つかの重ね合わせ且つ折り重ねた層のゲルを通して進む。個々のDNA分子は、全体の群から独立的に観察することは出来ない。最も薄く拡散したゲルでさえも、厚過ぎて、該ゲルを通じて移動する個々のDNA分子を空間的に追跡したり、DNA分子の群から隔離することは出来ない。

一回の実験で一つのゲルを使用したならば、そのゲルは汚染され、再使用することは出来ない。ゲルは各実験で実際に使用された材料と相互作用し、後で再使用するためにそのゲルを洗浄することは出来ない。このため、一回使用しただけで、ゲル層は処分しなければならない。このことは、反復可能性という科学的な目的を更に損なうことになる。

最後に、単純なゲル電気泳動法を使用して、長さが約20キロ塩基対よりも大きいDNA分子を分画することは出来ない。この事実を解決するため、より長いDNA分子を分画するために、印加される電界をパルス状にすることが公知である。しかしながら、この技術の結果、移動度が極めて低くなり、有意義な分画を達成するためには、数日間の実験期間が必要となる。また、この技術の結果を説明するために開発された数値的な予見は、ゲルの格子の十分に把握されていない孔の大きさ及び分布状態に臨界的に依存する。

細胞分画に関して、細胞の可撓性は、細胞生物学者にとって関心のある構造的な変数である。細胞の可撓性、及び細胞の可撓性に対する各種の環境の影響は、細胞の老化過程の研究にとって重要である。しかしながら、細胞の可撓性を利用した細胞の分画は、従来技術の装置では容易に行われていない。

例えば、各種の細胞は、各種直径の円形又は楕円形の形状をしている。これらの形状は、その下方の細胞骨格により決まることが多い。

細胞が人体内を循環するとき、細胞は、各種寸法の開口部及び通路を通らなければならない場合がある。このためには、細胞の顕著な可撓性を必要とする。細胞の老化、特別な化学的環境に対する反応及びその他の代謝性変化に起因して、こうした開口部を通過し得ないことがある。赤血球に関しては、赤血球細胞の可撓性が低ければ、より大きい有機体に重大な結果が生じる。癌細胞のような細胞に関しては、可撓性が低ければ、腫瘍が成長し且つ拡がる可能性がある。

癌細胞は、一般に、細胞自体よりも大きい人体の血管内に定着し、特殊な接着分子を通じてこうした血管に固着すると考えられている。癌細胞がこうした血管に固着するに伴い、新たな腫瘍が成長し始める。しかしながら、新しい情報によれば、癌細胞は移動速度が非常に速いため、このようにして血管に接着することは出来ないことが確認されている。現在では、癌細胞が通過するには狭小過ぎる



血管内に固着したときに、細胞が新たな腫瘍を成長させ始めると考えられている。癌細胞の可撓性は、その細胞の有害な作用を判断する上で重要である。

多くの細胞の可撓性に影響を与える三つの物理的制約がある。第一に、多くの細胞は、変形するとき、一定の容積  $V$  及び一定の表面積  $A$  を保たなければならない。第二に、細胞薄膜は、極めて可撓性であるが、面積を増大させることは出来ない。細胞は、無理に面積を大きくしようとすれば、引き裂ける。第三に、細胞は老化に伴い、その薄膜を失い、また、その表面对容積の比率が低下する。

例えば、両凹の赤血球細胞の最大径は約  $8 \mu\text{m}$ 、表面積は約  $140 \mu\text{m}^2$ 、及び通常の状態の容積は約  $95 \mu\text{m}^3$  である。成熟した赤血球細胞の場合、直径約  $3 \mu\text{m}$  以下の開口に対して、一定の容積  $V$  及び表面積  $A$  の制約を満足させることが出来ない。このため、赤血球細胞がその大きさの通路を通ろうとすれば、薄膜は引き裂ける。最小の毛管開口部は、約  $3.5 \mu\text{m}$  に過ぎないため、毛管床を通過する赤血球細胞は、引き裂ける状態に望ましくない程に近い。従って、変形を制御する物理的変数に僅かな変化が生じて、細小血管症及び有機体の顕著な窮迫を生じる。

細胞の可撓性及び変形可能性を測定する幾つかの技術が存在する。これらは、精密で且つ先駆的なマイクロピペットによる吸引技術から、ヌクレオポアろ過 (nucleopore filtration) 及び層状応力延伸 (laminar stress elongation) 技術が含まれる。後者の技術は、エクタサイトメトリー (ektacytometry) と呼ばれている。これらの全ては極めて有効であり、赤血球細胞の変形を研究する上で優れた最初のデータベースを提供するものであるが、その各々には、それぞれの欠点がある。

マイクロピペットによる吸引技術は、一度に一つの細胞しか研究することが出来ない。ヌクレオポアろ過技術は、細胞が開口部を実際に通過する間に、細胞を観察することが出来ない。エクタサイトメトリーは、狭小な通路内で細胞を変形させない。

従って、本発明の第一の目的は、巨大分子、ウィルス、遊離細胞及び微細粒子のような微細構造体を分画する、改良に係る方法及び装置を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、DNA分子、蛋白及び重合体のような巨大分子の挙動及び構造の研究を促進することである。

従って、本発明の一つの目的は、現在、かかる巨大分子の分画に適用されている電気泳動法技術の有効性を向上させることである。

本発明のもう一つの目的は、パルス状電界を使用せずに、長さが20メガ塩基対以上のDNA分子の分画を可能にすることである。

本発明の更に別の目的は、妨害された環境の格子構造体が自由に設計することが出来、また、一定の反復可能性により再現可能である、巨大分子の電気泳動法を行うための妨害された環境を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、その孔の分布、大きさ及び形状が略一定である格子構造体を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、その過程中、個々の巨大分子を同時に観察しつつ、巨大分子を分画する装置を提供することである。

本発明の更に別の目的は、赤血球細胞、癌細胞及びE.コリ細胞のような遊離細胞の構造体及びメカニズムの研究を促進することである。

本発明の更に別の目的は、生物学的マーカーにより検出することが困難なその弾性及びその他の物理的性質に従って、細胞を分画する装置を提供することである。

特に、本発明の一つの目的は、細胞が単一列の略単一層として通路を通過する間に、その細胞の挙動を観察する方法及び装置を提供することである。

本発明の更に別の目的は、区分中の微細構造体により汚染されない微細構造体を区分し且つ観察するための装置を提供することである。

本発明のもう一つの目的は、電気泳動法を実施する間の巨大分子の移動度を増すことである。

本発明の更なる目的及び利点は、以下の説明に記載されており、また、その一部は以下の説明から明らかとなり、又は本発明の実施により認識することが可能である。本発明の目的及び利点は、特に、請求の範囲に記載した手段及びその組み合わせにより認識し且つ実現することが可能である。

上記の目的を達成するため、また、本明細書に従って具体化され且つ本明細書に広く記載された本発明に従い、流体培地内の遊離細胞、ウィルス、巨大分子又は微細粒子のような個々の微細構造体を分画し且つ同時に観察するための区分装

置が提供される。該区分装置は、微細構造体を略単一の層にて観察することを可能にし、これにより、特定の微細構造体を全体を通じて追跡することが出来る。本発明の教示内容を具体化する装置の一つの実施例は、その側部に設けられた深さの浅い受容器を有する基層を備えている。該受容器は、第一及び第二の端部と、底部分とを備えており、該底部分の両側部は、該受容器の第一及び第二の端部の間を伸長する、対向した一对の直立側壁により画成されている。微細構造体が該受容器の第一の端部から該受容器の第二の端部まで移行する結果、該受容器に対する移行方向が画成される。側壁の高さが受容器の深さを画成する。この深さは、流体培地内の微細構造体の大きさに対応し、これにより、微細構造体は、略単一の層として受容器を通じて流体内で移行する。

本発明の一つの形態によれば、該アレーは、移行方向と交差する第一及び第二の端部の中間にて、受容器内に配置された変位手段を更に備えている。該変位手段は、微細構造体と相互作用し、微細構造体が流体培地内で移行方向に移行するのを部分的に妨害する。

かかる変位手段の一つの実施例において、受容器の底部から直立する妨害体配列が提供される。この妨害体配列は、所定の且つ再現可能なパターンにて配置されている。これらの妨害体は、ポスト、パンカー、V字形及びカップ状構造体及びその他の形状の構造体を備えることが出来る。好適な実施例において、該受容器及びその内部の妨害体配列は、マイクロ・リソグラフィ技術を利用して基層の一側部に同時に形成される。

本発明のもう一つの形態によれば、該装置は、受容器を覆うと共に、微細構造体を変位手段のみを通じて略単一層にて移行させる、変位手段の上方に配置された頂上手段を更に備えている。該頂上手段は、変位手段と該頂上手段との間で微細構造体移行するのを阻止し得るように、変位手段に固着されている。本発明の教示内容を具体化する一つの装置の一実施例において、かかる頂上手段は、対

の直立の対向側壁の一方から対の直立の対向側壁の他方まで、基層を横断して伸長するカバースリップを備えており、妨害体の頂部は、該カバースリップの隣接する側部に接合した配列内にある。該カバースリップ及び基層は、同様の熱膨張率を有することが望ましい。また、該基層及び妨害体配列は、通常の温度範囲で

その内部の分画すべき微細構造体と相互作用しない材料から成ることが好ましい。該カバースリップは、選択随意的に透明として、これにより、区分を行う間、微細構造体を視覚的に観察し得るようにすることが可能である。このカバースリップの透明な形態は、以下にキャップ手段として説明する機能を実施し得る構造体の一例である。

本発明の教示内容を具体化する装置のもう一つの形態において、該妨害体配列は、流体培地を通じて受容器の一端から他端まで移行するように帯電した微細構造体を励起するために使用される電界を受容器内に発生させる電力手段を備えている。一つの実施例において、かかる電力手段は、受容器の第一の端部に配置された第一の電極と、受容器の第二の端部に配置された第二の電極とを備えることができる。これらの電極は、受容器の底部に配置された金属ストリップを備えることができる。第一及び第二の電極の間に電源が電氣的に結合される。

本発明の更に別の形態において、本発明の教示内容を具体化する装置は、妨害体配列内で発生された電界の強さを検出する、妨害体配列内に配置されたセンサ手段を更に備えている。該センサ手段は、所定の方法にて電界の強さを変更するため、電力手段と電氣的に結合することが選択随意的に可能である。センサ手段の一つの実施例において、第一及び第二のセンサ電極が妨害体配列内に配置されており、該妨害体配列内の電界を所定の強さに保つよう、制御手段が第一及び第二の電極に結合されている。

本発明の一つの実施例において、かかる制御手段は、第一及び第二のセンサ電極にそれぞれ結合された第一及び第二の入力端子を有する差動増幅器回路を備えている。該差動増幅器回路は、第一及び第二のセンサ電極の間の配列内の電界の強さに対応する出力信号を発生させる。差動増幅器の出力信号と、配列内の電界の所定の強さを現す基準電極との差を示す制御信号を発生させ得るよう、比較器

手段が差動増幅器に結合されている。該比較器手段により発生された制御信号に従って電界の強さを変化させるドライバ手段が比較器手段に結合されている。

また、本発明は、上述のような装置を製造する方法をも対象にするものである。この方法において、一対の直立の対向側壁により画成された底部分を有する基層の一側部に受容器が形成される。妨害体配列が該受容器内に組み込まれている。

受容器を形成する段階と、配列を構成する段階とは、同時に行われることが好ましい。このためには、妨害体配列の頂部に対応させようとする基層の領域上にフォトレジスト層が配置される。次に、基層を受容器の深さに等しい所定の深さまでエッチング処理する。その結果、その内部に直立の妨害体配列を有する受容器が形成される。次に、フォトレジスト層を基層から融解させる。

最終的に、本発明の方法は、透明なカバースリップを各妨害体の頂部に固着する段階を含む。このためには、カバースリップは、各々の頂部と接触する状態で妨害体配列の上方に配置する。カバースリップと妨害体配列との間に電界が印加される。

また、本発明は、個々の微細構造体の区分及び観察を同時に行う方法をも対象とするものである。この方法において、微細構造体が流体培地内に配置され、上述のように、装置の一端の内部に導入される。次に、微細構造体は、妨害体配列を通じて流体内を移行するように励起され、その過程中、視覚的に観察される。

本発明の範囲内の更なる実施例は、細胞の可撓性及び細胞に対する各種の環境の影響を研究するため、流体培地内の細胞の区分及び観察を同時に行う装置に関するものである。該装置は、その一側部に配置された深さの浅い受容器を有する基層と、略単一層で且つ単一の列にて細胞が受容器を通るのを許容し得るよう、受容器内部に配置された通路手段とを備えている。本発明の一つの実施例において、かかる通路手段は、細胞がそこを通ることの出来る、受容器内に配置された通路を備えている。

該装置は、細胞の移動中に消費されるエネルギー量を測定するために使用することが出来る。

本発明の上記及びその他の利点並びに目的が実施時に達成される方法を理解し易くするために、次に、単に一例としてのみ、添付図面を参照しつつ、図面の好適な実施例について説明する。勿論、これらの図面は、本発明の典型例を示すものに過ぎず、このため、その範囲を限定するものと見なすべきではないことを理解すべきである。

添付図面において、

図 1 は、本発明の教示内容を具体化する区分装置の一実施例の斜視図、

図 2 は、その間の妨害体配列をより明確に示すため基層から分離した状態の透明なカバースリップを示す、図 1 の装置の分解図、

図 3 は、線 3-3 で囲った部分の図 2 の列領域内の妨害体の拡大図、

図 4 は、線 4-4 で囲った図 3 の列の領域内の妨害体の更に別の拡大図、

図 4 A は、図 4 に示した二つの妨害体及び図 4 の線 4 A-4 A に沿ったその間の格子孔を示す平面断面図、

図 5 A-図 5 F は、図 1 に示した区分装置のような区分装置を製造する方法の段階を示す図、

図 6 は、DNA 分子が列を通して移行する状態を示す妨害体を拡大した区分装置の平面図、

図 7 は、妨害体が V 字形である本発明の教示内容を具体化する区分装置内の配列内に使用可能な妨害体の代替的な実施例の平面図、

図 8 は、妨害体がカップ状の形状である本発明の教示内容を具体化する区分装置内の配列内に使用可能な妨害体の更に別の代替的な実施例の平面図、

図 9 は、一対のセンサ電極が区分装置の配列内に配置された、本発明の教示内容を具体化する区分装置の更に別の実施例の平面図、

図 10 は、妨害体列内の頂部センサ電極の位置を示す、線 10-10 に沿った図 9 の装置の断面平面図、

図 11 は、頂部センサ電極の位置を示す、線 11-11 に沿った図 9 の装置の断面平面図、

図 12 は、妨害体列の外側における頂部センサ電極の位置を示す、線 12-1

2 に沿った図 9 の検出装置の断面平面図、

図 1 3 は、図 9 に示した検出装置の実施例に示した対のセンサ電極と関係付けられたフィードバック回路の概略図的な電気系統図、

図 1 4 は、内部に移行する細胞を有する浸透配列の一部を示す、本発明の範囲内の別の実施例の拡大平面図、

図 1 5 は、人体の通路を通る細胞を模擬する細胞の挙動を模擬するため、本発明の教示内容を具体化する区分装置内の配列の代替的な実施例による妨害体を示す拡大斜視図、

図 1 6 は、その列を通して移行し得るよう変形し得る細胞を示すために拡大した、図 1 5 の型式の妨害体を利用する本発明の教示内容を具体化する一実施例の区分装置の平面図、

図 1 7 A 乃至図 1 7 E は、図 1 5 及び図 1 6 に示した型式の二つの隣接する妨害体間の健康な円形の細胞の移動状況を詳細に示す図、

図 1 8 A 及び図 1 8 B は、図 1 5 及び図 1 6 に示した型式の二つの隣接する妨害体により形成された狭小部分を通るように変形することの出来ない不健康な細胞の移動状態を詳細に示す図である。

本発明は、多くの種類の微細構造体の分画を容易にする方法及び装置を提供するものである。例えば、本発明の好適な実施例は、単一分子であるような極めて長い染色体の DNA 分子が少量しかないときでも十分に分画することを可能にするものである。本発明のその他の好適な実施例は、赤血球細胞のような遥かに大きい巨大構造体の分画を容易にするものである。かかる適用例については、以下に説明する。

先ず、DNA 分子の分画に関して、巨大分子の分画について特定の対象に対して説明するが、蛋白、重合体、ウィルス、細胞及び微細粒子のようなその他の巨大分子及び微細構造体の分画も本発明の範囲に属すると考えられることに留意すべきである。

重合体の移動度が著しく制限される複雑な環境内で長い重合体を拡散させることは、挑戦すべき統計物理的な問題であり、また、生物科学にとって極めて重要

な問題である。ゲル中のDNAのような帯電した重合体を長さで分画することは、分子生物学の基本的な手段である。しかしながら、複雑な環境内の長い重合体の長さに依存する移動度の背後にある物理的原理を定量的に理解するための主たる障害の一つは、その妨害環境、即ちゲル、の性質の特徴を十分に把握し得ないことである。しかしながら、本発明の教示に従えば、極めて十分に特徴が把握され且つ安定的に再現可能である複雑な環境を発生させることが可能である。

図1を参照すると、流体培地内の遊離細胞、巨大分子及び微細粒子のような略単一層の微細構造体の分画及び観察を同時に行う区分装置20が示してある。区分装置20は、その一側部26に配置された深さの浅い受容器24を有する基層

22から成っている。図示した実施例において、受容器24は、基層22の側部26にて凹所を成しているが、受容器24のような凹所部分を形成するその他の構造体も、本発明の実施例で作用可能である。

受容器24は、一对の直立の対向側壁30、31と、第一の端部32と、第二の端部34とにより画成された、図2により明確に示した底部分28を備えている。側壁30、31の高さは、受容器24の深さを画成する。受容器24の深さは、区分装置20内で区分すべき微細構造体の大きさに対応している。受容器24の深さは、受容器24の流体培地内の微細構造体が略単一層を形成し得るように特別に設定してある。このように、微細構造体を受容器24を通じて流体培地内で移行するとき、微細構造体は、略単一層にて移行する。この微細構造体の移行方向は、区分装置20に関して設定された矢印Mで示す方向である。

基層22は、フォト・リソグラフィにより加工することの出来る任意の型式の材料で形成することが出来る。シリコンが望ましいが、石英及びサファイヤのようなその他の材料も使用可能である。

本発明のある実施例の好適な特徴によれば、受容器24の第一の端部32及び第二の端部34の中間にて受容器24を覆うと共に、微細構造体を容器24内で略単一層として移行させる頂上手段が設けられる。一例として且つ限定的ではなく、図1に示すように、カバースリップ36は、基層22内の受容器24を横断して対の直立の対向側壁30の一方から上記対の直立の対向側壁31の他方まで



伸長する。カバースリップ36を基層22の側部29に結合する方法について、以下に詳細に説明する。

本発明の一部の実施例の好適な特徴によれば、区分装置20のような区分装置には、受容器24内に配置された変位手段が設けられており、該変位手段は、微細構造体と相互作用させ、微細構造体はその移行方向に移行するのを部分的に妨害すべく、その該当する移行方向を逆にする。

図2の分解図に示すように、本発明に従って利用可能なかかる変位手段の一つの形態は、受容器24の底部28から直立する微細な妨害体39の配列38である。妨害体39は、区分装置20の特定の区分対象物を前進させ得るような寸法とし且つ分離されている。妨害体39の配列38を形成する方法、及びかかる列

内で利用可能な妨害体の実施例の数について以下に詳細に説明する。

カバースリップ36は、微細構造体が妨害体39とカバースリップ36との間で移行しないように妨害体39の配列38内の頂部に固着されている。カバースリップ36は、選択随意的に透明とすることが出来る。この形態において、カバースリップ36は、上述の頂上手段の機能を果たすのみならず、受容器24のような深さの浅い受容器を覆うと共に、微細構造体が配列38を通して移行する状況を視覚的に観察するためのキャップ手段としての機能も果たす。カバースリップ36は、任意のセラミック材料で形成することが出来る。パイレックス (pyrex) が好ましいが、例えば、石英及びサファイヤのようなその他の材料も使用可能である。

本発明の一部の実施例の好適な特徴によれば、区分装置20のような区分装置には、受容器24内の流体培地内に電界を発生させる電力手段が設けられる。該電界は、電界の極性及び微細構造体がプラス又はマイナスに帯電されているかどうかにより、第一の端部32から第二の端部34に、又は第二の端部34から第一の端部32の何れかに流体培地を通じて移行するように微細構造体を励起させる。DNA分子のようなマイナスに帯電された微細構造体は、プラス極に向けて流れるように励起される。蛋白のようなプラスに帯電された微細構造体は、マイナス極に向けて流れるように励起される。

一例として且つ限定的ではなく、第一の電極40は、図2において、受容器24の第一の端部32内に配置され、第二の電極42は、受容器24の第二の端部34に配置されている。これら第一の電極40及び第二の電極42は、その各々が受容器24の底部28に配置された金属ストリップを備えている。好適な実施例において、該金属ストリップは、金で蒸着して形成されている。

第一の電極40がマイナス極を有する一方、第二の電極42がプラス極を有するように、バッテリー44、又はその他の電源が第一の電極40と第二の電極42との間に電氣的に結合されている。これら第一及び第二の電極40、42の間に発生される電界は、直流であるが、バッテリー44に代えて交流の電源を使用することも本発明の教示内容に適合するものである。

移行するように励起される微細構造体がDNAである場合、受容器24内の電界の強さは、約 $0.1\text{V}/\text{cm}$ 乃至約 $10\text{V}/\text{cm}$ の範囲にある。図2の好適な実施例において、電界の強さは約 $1.0\text{V}/\text{cm}$ である。

次に、図3を参照すると、線3-3で囲った図2の部分が拡大図で示してある。図3には、本発明による区分装置内で使用される変位手段の一例が示してある。図示するように、配列38は、受容器24の底部28から直立する複数の妨害体39を備えている。図3には、妨害体39が順序通りで且つ均一なパターンにて配列38内に配置された状態で示してあるが、互い違いの配置パターン、又は任意の所望の所定の且つ再現可能なパターンとすることも本発明の範囲に属する。

図4には、典型的な妨害体39の各種の寸法が示してある。妨害体39の高さHは、受容器24の底部28に対して直角の方向に測定したものである。妨害体39の長さLは、上記移行方向Mに対して平行な方向に測定したものである。妨害体39の幅Wは、移行方向Mに対して直角な方向に測定したものである。妨害体39の各々は、所定の分離距離S<sub>1</sub>だけ、隣接の妨害体39から分離されている。受容器24の底部28に対して直角に測定したときの配列38の断面内の隣接する妨害体39間のスペースが、配列38の妨害体39により累積的に形成される格子構造体の孔54を画成する。参照し易いように、図4にかかる典型的な

孔54は斜線で示してあるが、以下に更に詳細に説明する。これらの寸法は、区分すべき微細構造体の種類、大きさ、配列の設計、その配列内の妨害体の種類に依存して、所望通りに変更し且つ設計することが可能である。

例えば、孔54を通じて移行する微細構造体が、DNA分子、ウィルス及び細菌細胞であるか、又は哺乳類の細胞であるかどうかにより、分離距離 $S_d$ は異なる。DNA分子が移行する場合、その分離距離 $S_d$ は、約 $0.01\mu m$ 乃至 $20.0\mu m$ の範囲内にある。ウィルス及び細菌の細胞が移行する場合、分離距離 $S_d$ は、約 $0.01\mu m$ 乃至約 $1.0\mu m$ の範囲である。哺乳類の細胞が移行する場合、分離距離は、約 $1.0\mu m$ 乃至約 $50.0\mu m$ の範囲内である。現在、この分離距離 $S_d$ は、分子の中心から外れる距離である、分子の旋回半径に略等しいことが好ましい。

また、妨害体39の配列38を通して移行すべき構造体に依存して、長さ $L$ も異なる。現在の好適な実施例において、この長さは、一般に、分離距離に等しい。高さ $H$ に関しては、妨害体の高さは、全体として $0.01\mu m$ 乃至約 $20.0\mu m$ の範囲

内とすることが出来る。より小さい微細構造体の場合、妨害体の高さは、約 $0.01\mu m$ 乃至約 $0.50\mu m$ の範囲である。より大きい巨大構造体の場合、その高さは約 $1.0\mu m$ 乃至約 $5.0\mu m$ の範囲とすることが出来る。

二つの妨害体39の断面図である図4Aには、典型的な孔54が平面図で示してある。孔54は、微細構造体がそこを通らなければならない、二つの妨害体39により画成された領域を圧縮する。孔54は、高さ $H$ 及び妨害体間の分離距離 $S_d$ により画成される。孔54の所望の寸法は、区分すべき微細構造体の大きさを基準にして設定される。本発明の好適な実施例の重要な特徴は、配列の孔寸法が設定出来るのみならず、その寸法が一定で且つ再現可能なことである。より安定的なデータを得ることが可能となる。

溶液中の重合体に適合するための長さ寸法を設定する特徴的な数値は、持続的長さであり、次式で求められる。

$$E I_A$$

$$P = -$$

$K_B T$ 、ここで、

$E$  はヤング弾性率、

$I_A$  は表面の慣性モーメント

$K_B$  はボルツマンの定数、

$T$  は絶対温度である。

約  $0.1M \cdot NaCl$  及び  $PH7.6$  である、正常な生理学的塩分濃度及び  $PH$  における  $DNA$  の場合、 $P$  は  $0.06 \mu m$  となる。その配列のエッチング処理深さが略  $P$  に等しく又はそれ以下である場合、本発明の範囲内で使用される装置の場合のように、重合体は、疑似二次元的環境内で移動していると見なすことが出来る。

本発明の教示内容を具体化する区分装置 20 のような区分装置の一つの好適な実施例において、基層 22 には、長さ約  $3.0mm$  の側部 30、31 と、長さ約  $3.0mm$  のそれぞれ第一及び第二の端部 32、34 とを有する受容器 24 が設けられる。妨害体 39 の各々は、高さ  $H$  約  $0.1 \mu m$ 、幅  $w$  約  $1.0 \mu m$ 、長さ  $L$  約  $1.0 \mu m$ 、及び分離距離  $S_d$  約  $2.0 \mu m$  である。これらの寸法は、区分すべき構造体に依存して異なり、妨害体 39 は、妨害体 39 の配列 38 を通って略単一層にて微細構造

体に移行するような妨害体 39 の寸法及び分離程度とする必要があることに留意すべきである。

本発明によるかかる装置を製造する好適な方法は、基層 22 の一側部に受容器 24 を形成する段階を含む。受容器 24 は、微細構造体を受容器 24 を通って流体内で略単一層にて移行するような寸法に形成する必要がある。更なる段階は、妨害体 39 内に妨害体 39 の配列 38 を形成する段階を含む。妨害体 39 の各々は、頂部 56 と、側部 57 と、底端部 58 とを備えている。妨害体 39 は、受容器 24 の底部 28 から所定の且つ再現可能なパターンにて直立している。一つ的好適な実施例において、妨害体配列は、複数のポストを備えている。

一例として且つ限定的ではなく、受容器内にポストを形成する状態は、図5 A乃至図5 Fに示してある。図5 Aに示すように、この形成段階は、妨害体39の頂部56に対応することを目的とする基層22の領域上に感光性のフォトレジスト層60を現像する段階を含む。これは、対応する半透明パターンを有するマスクを通じて基層22を露光させることにより行われる。

光に露出されるフォトレジスト層60の部分は、塩基性の現像溶液中で溶解性となる一方、非露出部分は基層22に残ったままであり、基層22を保護する。このように、現像溶液中で現像した後、基層22には、マスクの半透明パターンと同一のフォトレジスト層60のパターンが残る。図5 Bには、光に露出させ且つ溶液中で現像した後の、フォトレジスト層60を有する基層22が示してある。

次の段階は、基層22をエッチング処理して、フォトレジスト層60により保護されない基層22の領域がエッチング処理され、これにより、受容器24を形成することを含む。エッチング処理した受容器24内の直立の妨害体39の配列38は、フォトレジスト層60で保護された基層22の部分により形成されている。図5 Cには、受容器24及び妨害体39を形成する状態が示してある。

図5 Cから理解され得るように、基層22がエッチング処理されるとき、フォトレジスト層60も腐食するが、その速度は遅い。図5 Cには、受容器24が半分形成され、フォトレジスト層60の一部がエッチング処理された状態が示してある。例えば、フォトレジスト層を基層22のエッチング速度の1/10の速度でエッチングする場合、形成される受容器の深さは、精々、フォトレジスト層の厚

さの10倍にしか過ぎない。従って、フォトレジスト層60の厚さは、これに応じて選択しなければならない。

エッチング処理工程は、受容器の所望の深さが得られた任意の時点で終了させることが出来る。図5 Dに示すように、エッチング処理を終了したときに、一部のフォトレジスト層60が依然として、基層22に残る場合がある。その場合、次の段階は、フォトレジスト層60を基層22から分離させることである。この段階の結果、図5 Eに示すような清浄な基層22が残る。

本発明の範囲内において、エッチング処理は、多くの種類の方法で行うことが出来る。好適な実施例において、頭上のイオンビームを使用して、基層22及びフォトレジスト層60をエッチングさせ得るように、イオン・ミーリング法が使用される。化学的腐食法のようなその他のエッチング処理方法も本発明の範囲に属する。

次に、図5Fを参照すると、カバースリップ36を基層22に溶着する段階が示してある。本発明の範囲内における好適な実施例にて、この段階は、カバースリップ36を妨害体39の配列38上に配置し、カバースリップ36が妨害体39の各々と接触するようにする段階と、次に、カバースリップ36との妨害体39の各々との間に電界を印加する段階とを備えている。このカバースリップ36は、マイナス電位に保持されている。妨害体39は、プラス電位に保持されている。これにより、イオンが励起されて、カバースリップ36と妨害体39との間を移行させて、全ての接触領域にてカバースリップ36と妨害体39の各々との結合部を形成する。この段階の過程は、電界支援の融着 (field assisted fusion) と呼ばれる。

カバースリップ36を基層22に融着させるために使用される電圧は、約1kVであることが好ましいが、200V乃至約2000Vの範囲内とすることが出来る。融着時間は、約400℃の温度にて約30分である。この温度は、約300℃乃至約600℃の範囲内とすることが出来るが、400℃が好適な温度である。本発明の範囲内における好適な実施例において、カバークリップは、パイレックス材料から成っている。しかしながら、任意の透明なセラミックを使用することが可能である。例えば、サファイア及び石英がカバースリップに使用可能な材料である。

カバースリップ36に使用される材料は、基層22と略等しい熱膨張率を有することが好ましい。さもなければ、高い融着温度のとき、カバースリップ36及び基層22は、異なる速度で膨張し、その二つの部分間の密封を実現することは困難か、又は不可能となるからである。

融着が良好に為し得たか否かの確認は、装置内に蛍光流体を注入することで行うことが出来る。完全に融着したカバースリップは、カバースリップ36と妨害

体39との間でいかなる蛍光流体が通過することをも許容しない。

図6には、本発明の一つの実施例の使用例が示してある。上述したように、本発明の装置は、帯電した巨大分子の電気泳動法に使用することが出来る。例えば、該装置には、蛋白の電気泳動法及びDNAの電気泳動法を行うために使用し、プラス極及びマイナス極はこれに応じて調節することが出来る。図6には、DNAの電気泳動法が示してある。

一例として且つ非限定的に図6に示すように、DNA分子68は、緩衝溶液中に投入し、また、受容器24の第一の端部32に設けられた装填領域66内に投入される。装填領域66は、妨害体39が全く形成されない箇所である受容器24の一部分を有する。第二の端部34に設けられた第二の装填領域67に緩衝液が添加される。また、第二の装填領域67は、妨害体が全く形成されない箇所である、受容器24の一部を有する。次に、この装填領域にカバーをする。

DNA分子68が位置決めされたならば、バッテリー44を作動させて、電界を発生させる。この電界は、マイナスに帯電されたDNAの微細構造体を励起させ、電界を通過して第一の電極40から受容器24内の第二の電極42に向けて移行させる。

DNA分子68が第一の端部32から第二の端部34に向けて移行するとき、その動きは、受容器24内の直立の妨害体39の配列38により妨害される。妨害体39とDNA分子68との間の相互作用は、図6に示してある。

図6において、DNA分子68は、長い矢印で示してある。これらの矢印の方向は、DNA分子68の移行方向を示す。DNA分子が妨害体39の配列38を通過して移行するとき、DNA分子の大きい集団は、妨害体39で引掛けて取り込むことが出来る。これら引掛けて且つ取り込んだDNA分子は、68aとして標

識する。図6に示すように、妨害体39がポストであるとき、DNA分子68は、引掛けられた際に、妨害体39の周りで延伸する。これらの妨害体は、大きいDNA分子を捕獲して、それらを電界に対して保持すると考えられる。DNA分子68の一部は、延伸し且つ自然に妨害体から解放される。より小さいDNA分子は、十分なブラウン運動をするから、自然に解放される。

本発明の範囲内で、妨害体39の配列38が任意のパターンで設定し得ることが、本発明の重要な特徴である。配列38は、順序立った均一な間隔の形成体を備えることが出来、そこでは、妨害体は、均一な横列及び縦列状に配置される。これと代替的に、配列38は、ずらして配置した形態とし、ここで、妨害体の位置は均一ではなく、配列の周りでかなりばらばらに配置されるようにしてもよい。更に、配列38は、該配列と交差する移行方向Mに沿ってかかる配置を混ぜ合わせることも可能である。

この配列の設計は、所望の任意の用途に合うように設定することが可能である。長いメガ塩基対のDNA部分の像を形成するためには、順序通りに均一に離間した形態を使用することが可能である。DNA分子がこの配列を通じて移行するとき、DNA分子が引掛かる可能性が大きいこのずらし配置は、DNA分子が動くときのDNAを弛緩させ及び引っ掛けるその働きをより直接的に試験するために、使用することが出来る。

また、この妨害体の形状は、本発明の範囲内で変更が可能である。図7に示したものは、受容器24の底部28から直立し、受容器24の底部28に平行に配置された面内にV字形の断面を有する、V字形の妨害体72の配列70が示してある。アーム73、74は、一端にて交差し、渦巻き部分75及び開放端76を形成する。V字形受容器72の上記V字形断面の開放端76は、受容器24の移行方向Mと反対方向に配置されている。

各種寸法の微細構造体がV字形妨害体72の配列70を通して方向Mに移行し、微細構造体が妨害され、V字形の妨害体72の開放端76内に取り込まれるように、V字形妨害体72の寸法を設定する。より小さいV字形の妨害体72は、小さい微細構造体を取り込む一方、より大きいV字形の受容器72は、小さい及び大きい微細構造体の双方を取り込む。

一つの配列70内に各種寸法のV字形の妨害体72を使用することが可能であると考えられる。例えば、より小さいV字形の妨害体72は、受容器24の第一の端部32に向けて配置し、より大きいV字形妨害体72は、受容器24の第二の端部34に向けて配置することが出来る。このようにすれば、微細構造体が第



一の端部 3 2 から第二の端部 3 4 に向けて移動するとき、小さい微細構造体は、小さい V 字形の妨害体 7 2 内に取り込まれる一方、大きい微細構造体は、その小さい V 字形の妨害体 7 2 を通過して流れる。大きい微細構造体が大きい寸法の V 字形の妨害体 7 2 を通って流れるとき、その大きい微細構造体も又、取り込まれる。次に、微細構造体は、寸法に従って分離される。

次に、図 8 を参照すると、本発明の範囲内の妨害体配列の代替的な実施例が示してある。図 8 には、カップ状の形状の妨害体 8 0 の配列 7 8 が示してある。妨害体 8 0 は、受容器 2 4 の底部 2 8 に対し平行に配置された面内にカップ状の断面を有する。

図示するように、カップ状の妨害体 8 0 は、微細構造体の移行方向に対し略平行である第一の脚部 8 2 及び第二の脚部 8 4 と、移行方向に対し略垂直な第三の脚部 8 6 とを備えることが出来る。これらの第一の脚部 8 2、第二の脚部 8 4 及び第三の脚部 8 6 は、それぞれ、開放端 8 8 を画成するように配置されており、微細構造体がカップ状妨害体 8 0 を通って移行するとき、微細構造体がこの開放端内に取り込まれるようにすることが出来る。V 字形の妨害体 7 2 の場合と同様に、配列 7 8 内には、各種寸法のカップ状妨害体 8 0 を所望の任意のパターンにて配置することが出来る。カップ状断面の開放端 8 8 は、受容器 2 4 の移行方向 M に対向する位置に配置されている。

如何なる型式の配列を使用すると、その配列が再現可能であることを認識することが重要である。更に、最も好適な設計が得られる迄、新たな実験毎に列に僅かな変更を加えることにより、好適な設計は、時間の経過と共に完全なものにすることが出来る。

次に、図 9 を参照し、且つ本発明の幾つかの実施例のもう一つの好適な特徴によれば、区分装置 1 1 0 は、区分装置 2 0 のような装置で構成されており、その内部の任意の所定の第一及び第二の点の間で受容器 3 9 の列 3 8 のような受容器の列内で発生される電界の強さを検出して、電界の強さを制御を可能にするセンサ手段が更に設けられている。

区分装置 1 1 0 は、図 9 に示してある。図 1 及び図 2 に示した区分装置 2 0 に

おけるように、区分装置 110 は、その間で発生される電界に対してマイナス極及びプラス極として機能する、第一の電極 40 及び第二の電極 42 とを備えている。その間で図 1 及び図 2 のバッテリー 44 のようなバッテリーを結合させることにより、該電界は、直流とすることが出来る。しかしながら、選択的に、又は何か反復的なパターンに従って交流である、即ち、切り替え可能な極性の電界を発生させることは、本発明の教示内容に適合したものである。しかしながら、区分装置 110 の場合、第一の電極 40 と第二の電極 42 との間に発生される電界は、以下に更に詳細に説明するフィードバックにより変化させたドライブ電圧回路 144 により励起される。

第一の電極 40 は、第一の端部 32 にて受容器 24 の底部 28 に沿って配置された金属ストリップを備えている。第一の電極 40 は、第一の領域 128 にて基層 22 及び各種の導線にはんだ付けされている。第二の電極 42 は、第二の端部 34 にて受容器 24 の底部 28 に沿って配置された金属ストリップを備えている。第二の電極 42 は、第二の領域 129 にて基層 22 及び各種の導線にはんだ付けされている。好適な実施例において、金属ストリップ、第一の電極 40 及び第二の電極 42 は、底部 28 内部に金を蒸着させて形成されている。

その内部の所定の第一及び第二の点の間で第一の電極 40 と、第二の電極 42 との間に発生された電界の強さを検出するセンサ手段が配列内に配置されている。該センサ手段は、発生された電界の強さを制御することを可能にする。

該センサ手段は、第一の所定の点 134 にて妨害体 39 の配列 38 内に配置された第一のセンサ電極 130 を備えている。該センサ手段は、第二の所定の点 135 にて妨害体 39 の列 38 内に配置された第二のセンサ電極 132 を更に備えている。第一のセンサ電極 130 は、受容器 24 の底部 28 に沿って形成された第一のセンサ通路 138 内で受容器 24 の第一の端部 32 に向けて、配列 38 内に配置されている。通路 138 内に妨害体 39 は存在しない。その内部にセンサ電極が配置された透明な領域が形成される。

本発明の一つの実施例において、センサ電極が配列内に配置される前に、該配列 38 は  $45^{\circ}$  の角度で曲げられる。

図9から理解され得るように、第一及び第二のセンサ電極130、132が受容器24の側壁31、カバースリップ36を通して基層22まで伸長している。第一のセンサ電極130の位置は、図10乃至図12から理解することが出来る。

図10において、第一のセンサ電極130は、第一のセンサ通路138内で受容器24の底部28に沿って配置された状態で示してある。妨害体39は、頂部センサ通路138の側部に沿って配置された状態で示してあるが、通路138自体の内部にはない。カバースリップ36は、妨害体39に融着され且つ通路138を覆う状態で示してある。

図11には、受容器24の側壁31から伸長する通路137が示してある。通路137内に妨害体は存在しない。カバースリップ36は、通路137の上方に配置された状態で図11に示してある。

図12には、第一のセンサ電極130が基層22にはんだ付けされ且つ以下により詳細に説明するように第一のセンサ導線152に接続される箇所である第一のセンサはんだ付け領域140が示してある。

第一のセンサ電極130のみの断面が示してあるが、第二のセンサ132が同一の方法で装置110内に配置されていることに留意すべきである。第二のセンサ電極132は、妨害体39の配列38内で底部センサ通路139内に配置されている。第二のセンサ電極132は、第二のセンサはんだ付け領域142にて基層22にはんだ付けされ且つ第二のセンサ導線154に接続されている。第二のセンサ導線154に関しては、以下に更に詳細に説明する。

第一の電極40は、第一の電極のはんだ付け領域128にて第一の電極40にはんだ付けされた第一の電極の導線146により、ドライブ回路144に電氣的に結合されている。第二の電極42は、第二の電極のはんだ付け領域129にて第二の電極42に接続された第一の接地部分148を介して接地されている。

第一及び第二のセンサ電極130、132は、フィードバック回路150を通じて互いに且つドライブ電極回路144に電氣的に結合されている。第一のセンサ電極導線152が第一のセンサ電極130をフィードバック回路150に接

続する。第二のセンサ電極の導線 154 は、第二のセンサ電極 132 をフィードバック回路 150 に接続する。

第二の接地導線 156 は、フィードバック回路 150 を接地部分に接続する。制御導線 158 がフィードバック回路 150 をドライブ電圧回路 144 に接続する。

一例として図示するように、図 9 のフィードバック回路 150 及び図 9 のドライブ電圧回路 144 のような電圧ドライブ回路の一実施例の具体的な構造の詳細は、図 13 を参照することにより、理解することが出来る。

説明の目的のため、図 13 に示すように、受容器 24 には、液体培地が充填されており、第一の電極 40 及び接地された第二の電極 42 の間で供給された入力電圧  $V_i$  が、この液体培地内で電界を形成する。

第一のセンサ電極 130 と第二のセンサ電極 132 との間にて受容器 24 内で液体培地内に発生された実際の電圧  $V_A$  は、可変レジスタ 159 にて生じる電圧の降下として示してある。レジスタ 159 は、配列 38 内の第一及び第二の所定の点の間の受容器 24 内で液体培地内に発生される電界に対する抵抗を示す。区分装置 110 のような区分装置が作動するとき、液体培地の組成は、多くの原因により変化する。その結果、液体培地の電気抵抗が変化する。

実際の電圧  $V_A$  は、二つの位置にて液体培地内で電圧が低下する量だけ、入力電圧  $V_i$  と本来的に異なる。これら二つの位置は、第一の電極 40 と第一のセンサ電極 130 との間及び第二のセンサ電極 132 と第二の電極 42 との間である。第一の電極 40 と第一のセンサ電極 130 との間の受容器 24 内の液体培地内の抵抗は、レジスタ 160 a として示してある一方、第二のセンサ電力 132 と第二の電極 42 との間の対応する抵抗は、レジスタ 160 b として示してある。

図 13 には、図 9 に示したドライブ電圧回路 144 及びフィードバック回路 150 の機能を果たすことを目的とする回路要素の一例としての配置が更に示してある。

区分装置 20 の場合と同様に、区分装置 110 には、受容器 24 内の液体培地内に電界を発生させる電力手段が設けられている。かかる電力手段の一例は、図 1 のバッテリー 44 のようなバッテリーである。

しかしながら、図9には、ドライブ電圧回路144の形態の電力手段の代替的な形態が示してある。図13により詳細に示すように、ドライブ電圧回路144は、入力レジスタ161を通じて差動増幅器162のマイナスの端子に結合された初期電圧 $V_0$ を有する。このようにして、差動増幅器162の出力端子に結合された第一の電極の導線146に付与される電圧は、入力電圧 $V_i$ に対して逆の極性となる。バイアスレジスタ163が差動増幅器162のマイナス入力端子とその出力端子との間で並列に結合されている。

ある実施例においては、入力電圧 $V_0$ は、バッテリーで提供することが出来るが、区分装置110に対してそれ自体可変である入力電圧 $V_0$ を付与することも考えられ、この入力電圧は、差動増幅器162のマイナス入力端子を通じて結合されているため、第一の電極の導線146を通じて第一の電極40に最終的に供給される入力電圧 $V_i$ に対して逆の極性に変更可能である。

本発明の一部の実施例の好適な特徴によれば、図9に示したように区分装置110のような区分装置は、配列38の任意の所定の部分で受容器24の液体培地内で発生された電界の強さを検出するセンサ手段を備えている。この検出された電界は、図13に示した実際の電圧 $V_a$ に対応する。図13において、実際の電圧 $V_a$ が測定される配列38の所定の部分は、第一のセンサ電極130に対応する列38内の第一の所定の点134と第二のセンサ電力132に対応するその内部の第二の所定の点135との間に位置している。

本発明の教示内容を具体化する区分装置に使用される、かかるセンサ手段の機能を果たすことの出来る回路手段の一例が、図13に示してある。これらの要素は、第一の所定の点134にて、妨害体39の配列38内に配置された第一のセンサ電極130と、第二の所定の点135にて配列38内に配置された第二のセンサ電極132とを備えている。本発明の教示内容によるセンサ装置は、これらと組み合わせて、受容器24内の液体培地の電界を所定の強さに保つように第一のセンサ電極130及び第二のセンサ電極132に結合された制御手段を備えている。

かかる制御手段の一つの実施例の構成要素は、フィードバック回路150を備える回路構成要素及びその機能的にグループ分けして図13に示してある。フィ

ードバック回路150は、制御導線158を通じて供給された制御信号を利用し、ドライブ電圧回路144により第一の電極40に供給された電圧を変化させる働きをする。フィードバック回路150の構成要素について、以下に詳細に説明するが、ドライブ電圧回路144の構成要素の最初の説明から、制御導線158を介してドライブ電圧回路144に供給される制御信号の作用は、一層、良く理解されよう。

制御導線158からの制御信号は、第二の入力レジスタ164を通じて差動増幅器162のプラスの入力端子に印加される。制御導線158に対する制御信号の作用は、実際の電圧 $V_A$ を安定させる目的にて、第一の電気導線146におけるドライブ電圧回路144の出力を変更することである。このためには、区分装置110の操作者が所望の所定の基準電圧よりも実際の電圧 $V_A$ が低いことを制御信号が表示するとき、受容器24内の流体培地内の電界の強さを増大させる。これに対応して、実際の電圧が同一の所定の基準電圧よりも大きいことを制御信号が表示するとき、制御導線158の信号を逆の極性にし、これにより、受容器24内の液体培地の電界の強さを低下させる。このようにして、ドライブ電圧回路144への制御導線158に供給される制御信号は、差動増幅器162の作用により、初期電圧 $V_0$ の実際の作用を調節し、実際の電圧 $V_A$ を任意の所望のレベルに保つ。

第一の電気導線146にて第一の電極40に供給される電圧に所望の変化を生じさせる機構として、制御導線158を通じてドライブ電圧回路144に供給される制御信号を利用することが出来る。しかしながら、殆どの状況にて、微細構造体はその内部で移行する液体培地の公知の特性は、蒸発、化学的反応及び温度変化のような多数のファクタにより、作動時間中に変化することが予想される。

フィードバック回路150に関して以下に説明する回路の第一の目的は、可変レジスタ159で示すような受容器24内の液体培地の可変の性質を補正することである。このようにして、実際の電圧 $V_A$ は、所定の一定の強さに保たれる。

図13に示すように、フィードバック回路150は、第一の入力端子167と、第二の入力端子168と、出力端子169とを有する差動増幅器回路166を備えている。第一の入力端子167は、第一のバッファ増幅器回路170を通じ

て

第一のセンサ電極 130 に結合される一方、第二の入力端子 168 は、第二のバッファ増幅器回路 171 を通じて第二のセンサ電極 132 に結合される。

第一のバッファ増幅器回路 170 は、上述の回路構成要素の間で図示した方法で接続された差動増幅器 172 から成っている。それに対応して、第二のバッファ増幅器回路 170 は、図示するように接続した差動増幅器 173 から成っている。第一及び第二の増幅器回路 170、171 の働きは、差動増幅器回路 166 のそれぞれ第一及び第二の入力端子 167、168 のインピーダンス・バッファとして機能することがである。

差動増幅器回路 166 内で、第一の入力端子 167 は、入力レジスタ 164 を通じて差動増幅器 175 のマイナスの入力端子に結合される一方、第二の入力端子 168 は、入力レジスタ 176 を通じてそのプラスの端子に結合される。レジスタ 177、178 は、差動増幅器 175 をその所望の作動子へ偏倚させるため、図 13 に示すように接続されている。図示し且つ説明した構成により、差動増幅器回路 166 は、受容器 24 内の液体培地における電界による実際の電圧  $V_a$  の強さに対応する出力信号をその出力端子 169 に発生させる。

本発明の幾つかの実施例の好適な特徴によれば、フィードバック回路 150 のようなフィードバック回路は、出力端子 169 における出力信号と実際の電圧  $V_a$  の所定の所望の強さに関する基準電圧との差を示す制御信号を制御導線 158 に発生させるため、差動増幅器回路 166 の出力端子 169 に結合された比較器手段を備えている。

一例として且つ図 13 に示すように、かかる基準電圧は、可変レジスタ 181 を通じてそのプラスの入力端子に結合された基準電圧  $V_R$  を有する差動増幅器 180 を備える基準電圧回路 179 により供給される。このようにして、可変レジスタ 181 は、基準電圧回路 179 に対する出力端子 182 にて差動増幅器 180 の出力側に現れる基準電圧  $V_R$  の作用を調整するために使用することが出来る。

図 13 に示した比較回路 183 は、差動増幅器回路 166 の出力端子 169 に

現れる出力信号と基準電圧回路 179 の出力端子 182 に現れる基準電圧  $V_*$  の部分との間に差があれば、その差を示す制御信号を制御導線 158 に発生させることを目的とするものである。この目的のため、比較回路 183 は、その出力端

子にて制御導線 158 に結合された差動増幅器 184 を備えている。差動増幅器 184 のプラスの入力端子は、入力レジスタ 185 を通じて差動増幅器回路 166 の出力端子 169 に結合される一方、差動増幅器 184 のマイナスの入力端子は、入力レジスタ 186 を通じて基準電圧回路 179 の出力端子 182 に結合されている。可変レジスタ 187、188 は、図示するように比較回路 183 内で接続されて、差動増幅器 184 に所望のバイアスを行わせる。

図 13 に示した回路において、差動増幅器 162、172、173、175、180、184 は、一例として、アナログ・ディバイスズ (Analog Devices) から製品番号 AD795N として入手可能である差動増幅器を備えることが出来る。かかる装置は、電界効果のあるトランジスタ入力を利用し、また雑音特性も少ない。図示したレジスタの値は、次の通りである。

$$R_1 = 10 \text{ k } \Omega$$

$$R_2 = 10^6 \Omega$$

分類装置 110 のような装置の場合、初期電圧  $V_0$  は、マイナス 15V である一方、基準電圧  $V_*$  はプラス 15V である。

図 14 に示した回路により、受容器 24 内の液体培地の性質が時間と共に変化するにもかかわらず、第一及び第二のセンサ電極 130、132 の間に所望の所定の実際的な任意の電圧を保つことが出来る。

微細構造体の移行を励起させる手段として電界について詳細に説明したが、例えば、流体力学、磁力及び重力のようなその他の場 (field) も使用することが可能であることを認識すべきである。

次に、細胞の分画に関して、図 14 乃至図 18 には、例えば、人間の赤血球、細菌細胞及び癌細胞のような細胞が、単一層及び単一系列の通路を通して動く状況を研究し易くするため、本発明の教示のもう一つの利用方法が示してある。赤血球細胞の場合、通路は、人体の毛管、肺胞及び脾臓に見られるような通路を模擬



することが出来る。更に、本発明の装置によれば、赤血球細胞は、生物学的マーカーにより検出することが困難な物理的な性質に基づいて分画することが出来る。

本発明の好適な実施例において、受容器24内に配置された通路手段は、略単一層及び単一列にて細胞が受容器24を通過して進むのを許容する。

本発明の範囲に属する全ての分画の配列のその他の可能な形態が図14に示してある。この配列192は、浸透配列と呼ばれており、一つの迷路としてパターン化されている。この形態において、通路手段は、迷路内に見られるような開放領域194、通路196及び閉鎖端部197を形成し得るよう各種の接続位置にて受容器24の底部28から直立の状態に配置された妨害体193を備えている。図14に示すように、細胞199は、開放領域194及び通路196を通じて浸透配列192を通過して移行し、閉鎖端197により適時、妨害される。通路196は、直線状、湾曲状又は細胞が各種形状の通路を通過して移行するのを観察するのに望ましい任意の形状で形成することが出来る。通路196の幅は、約 $1.0\mu\text{m}$ 乃至約 $10.0\mu\text{m}$ であり、その深さは、約 $1.0\mu\text{m}$ から約 $10.0\mu\text{m}$ の範囲にある。単一の列にて移行する細胞は、199aとして標識して、観察することが出来る。

本明細書に記載した浸透とは、別個の部分が無作為に追加することにより、許容される動作に対する経路の連結程度を増す現象を意味するものとする。浸透の閾値にて、配列を通過する平均して一つの経路があり、その他の全ての経路は、閉鎖端に達するようにする。本発明の上記の実施例の浸透配列192により、細胞がその経路を見つけ出し得るかどうかを観察することが出来る。

本発明の範囲内において、好適な浸透実施例にて、浸透配列192は、矩形の格子上に形成されている。単一のコンピュータ・アルゴリズムが例えば、40%、その格子の一部分を線分で充填し、各種の開放領域194及び通路196を形成し得るようにする。次に、不透明なマスクにコンピュータ・プログラムを実行し、上述のマイクロ・リソグラフィ法を実施する。

好適な実施例において、妨害体193は、長さ $5.0\mu\text{m}$ 及び幅 $1.0\mu\text{m}$ のバリヤから成っている。浸透配列192の所望のエッチング深さは $0.35\mu\text{m}$ である。図

14には、かかるフォト・マイクログラフの浸透配列192の拡大断面図が示してある。

浸透配列192の使用例の一例は、E.コリーのような細胞が配列192の一端から他端まで動く動作を研究することである。一つの実験例において、E.コリー細胞は、受容器24の第一の端部32に配置した一方、受容器24の第二の端部34には食物を配置した。次に、E.コリー細胞が、浸透配列192を通して単一層にて第一の端部32から第二の端部34に向けて移行する状態を観察した。E.コリー細胞が閉鎖端197に達したときに、E.コリー細胞自体が閉鎖端197から動いて離れるために、その方向を変更する状態も観察した。また、E.コリー細胞が第一の端部32における開始点から第二の端部34における食物に至る開放経路を見つけることが可能であるか否かも観察した。

また、E.コリー細胞について実施した研究は、その他の多くの種類の細胞にも実施することが出来る。その他多くの種類の遊離した浮遊細胞がバリア及び通路にぶつかったときに、流体懸濁液内でそれ自体の方向を変更する状態、及び各種の通路が選択される状態を、浸透配列192を使用して研究することが出来る。

上述のように、浸透配列192は、単一層及び単一系列にて細胞が移行する状態能が観察可能であるように形成されている。このため、観察すべき各種寸法の細胞に対応するため、各配列192内の開放領域194及び通路196の寸法を必要に応じて設定することが可能である。また、配列のパターンも所望に応じて設定することが出来る。任意のパターンを作成し且つ再現することが可能である。

浸透配列192の一つの更なる重要な特徴は、浸透配列92内で帯電した球状ボールについて電気泳動法を行うことが出来る点である。浸透出口付近で浸透配列内に多数の閉鎖端が存在するから、簡単なボールでもその移動度は、浸透配列内で大きい。電界が過度に大きいと、ボールは、閉鎖端から出て印加される電界に対して後方に拡散することが出来ない。従って、移動度は、臨界的な場の上方で停止する。正確な寸法の蛍光ボールの拡散状況を測定すれば、その配列内の重合体の拡散程度を研究することが可能となる。

次に、図15を参照すると、本発明のもう一つの実施例が示してある。図15において、細長の矩形のバンカー202の形態による妨害体の配列200が受容器24内に配置されている。これらのバンカー202は、対向する側壁203と頂部204とを有する矩形の形状をしている。バンカー202は、受容器24の底部28から直立している。バンカー202は、容器24内で縦列及び横列内に配置されている。細胞は、縦列を通り且つバンカー202の横列の間を矢印Mで示した移行方向に移行する。バンカーの長手方向軸線は、移行方向Mと整合状態

に配置されている。通路206がバンカー202の横列の間に形成されており、この通路を通して細胞が移行する。バンカー202の横列の間の分離距離 $S_1$ は、通路206の寸法を示す。

バンカー202の寸法及び構成は変化させることができるが、本発明の範囲内の好適な実施例においては、分離距離 $S_1$ は、細胞が通路206を通して略単一層で且つ単一系列にて移行するのを許容し得る寸法である。

また、各バンカー202の高さHは、細胞が略単一層にてバンカー202を通過するのを許容し得るように設定する必要がある。DNAを分画する装置の場合ように、カバースリップ36がバンカー202の頂部204に融着されて、カバースリップとバンカー202の頂部204との間で細胞が移行するのを防止し、細胞が確実に略単一層にてバンカー202の配列200を通して移行するようにする。

バンカー202は、通路206を形成する好適な妨害体であるが、細胞が移行し且つ観察することの出来る通路を模擬するために別の構造体を使用することも可能である。これら代替的な構造体も本発明の範囲に属する。

図16には、細胞を区分し且つ分画する装置212が示してある。一例として且つ限定的ではなく、細胞214がバンカー202の列200を通して移行する状況が示してある。通路206を通して横列のバンカー202の間を細胞214が移動する状態が示してある。一部の細胞は丸くなり始めて、通路206に合うように変形し、通路を出たならば、その元の形状に戻る。しかしながら、ある程度、その変形能力を失ったその他の細胞は、その形状を回復せずに、又は最初か

ら奇形である。一部の細胞は、これらの狭小な通路内に取り込まれる。これは上述のように老化、病気又はその他の生体内又は生体外の問題点が原因である。

説明のため、細胞214は、ディスク状の形状で示してある。細胞214が通路206に入ると、細胞214は、ディスク状の形状から細長の形状に変形して通路206を通じて圧搾されるようにする。細胞214がバンカー202の間、及び通路206内に位置するとき、細胞214は、薄い細長の形状をしている。細胞214がバンカー202の間から開放スペース内に移動すると、健康な細胞214は、その最初のディスク状の形状を回復することが観察される。健康でな

い細胞は、塑性流の不足のため、その最初の形状を回復し得ないことが確認された。本発明の装置により赤血球細胞の可撓性及び変形可能性を研究することが出来る。

図17A乃至図17Eには、一対のバンカー202を通して移動する個々の細胞214が示してある。図17Aに図示するように、バンカー202を通過する前、細胞214は、完全なディスク状の形状をしている。図17Bにおいて、細胞214は、通路206内でバンカー202の間に適合し得るように変形し始めるのが分かる。図17Cには、通路206に適合し得る細長の薄い形状に変形した細胞214が示してある。図17Dに示すように、細胞214が通路206から外に動き出すと、細胞214は、その最初のディスク状の形状を回復し始める。図17Eに示すように、通路206から完全に外に出たならば、細胞214の弾性により、細胞214は、完全にその最初のディスク状の形状を回復する。

一方、図18A及び図18Bには、その弾性的性質が失われた不健康な細胞216が示してある。不健康な細胞216は、健康な細胞の最初の円形のディスク状の形状をしているが、その可撓性は、通路206内に適合するように変形し得ない程度に低下している。細胞216が通路206を通るとき、細胞216は、通路206に適合するよう、薄く細長の形状に変形することは出来ず、通路206の開口部に固着する。癌細胞の場合、癌細胞が固着すると、新たな腫瘍が成長すると考えられる。本発明の教示内容により、癌細胞の活性を研究することが可能である。

このように、本発明による装置を使用することにより、細胞の弾性及び可撓性の研究が可能となる。更に、細胞の塑性流の不足の結果を観察し且つ研究することが可能である。更に、細胞が変形し且つその形状を回復するために細胞が消費するエネルギー量を容易に測定し且つ記録することも可能である。

本発明による装置のもう一つの重要な利点及び用途は、各種の科学的環境における細胞の物理的性質を研究し且つ観察し得ることである。例えば、配列200のような配列を細胞が配列を通じて移行するのを許容する前に、放射線、光照射又は鎌状現象による制限のような各種の化学的環境に露呈させることが出来る。細胞がこれら各種の環境を経て移行するときの細胞の反応を研究することが出来る。

例えば、どの種類の化学的反応が細胞の老化の原因となり、細胞の可撓性の機能を失わせるかを判断するための実験を設定することが出来る。癌細胞に対する化学的影響を判断するために、その他の実験を設定し且つ実施することが可能である。最終的に、無限の数の細胞作用を観察することが可能である。

また、データを確認し、又は実験対象に対して僅かな変更を加えるために実験を容易に反復し得る点も有利である。このように、所望の物理的性質、即ち各種の環境に対するその反応により細胞を区分することも可能である。細胞を区分した後、その細胞を分離し且つ採取することが出来る。

細胞を研究する点で、本発明による装置のもう一つの重要な利点は、対象物の配列を再形成し且つ再現することが可能なことである。例えば、配列200のような配列は、何千回も反復可能である妨害体で形成することが出来るから、細胞薄膜内の少量の僅かな変化でも増幅することが出来る。従って、個々の細胞が例えば、配列200内の通路206のような装置の通路を通じて移行するとき、本発明の装置により、多数の個々の細胞を観察することが出来る。複数の細胞を同時に観察することが可能である。

本発明による装置を通る細胞の移動度に関して、細胞は、各種の電界を使用して、例えば、配列200のような配列を通じて移行することが出来る。例えば、水圧を使用して細胞を配列を通じて付勢させる、フロー血球計算法を通じて、流体が流体力学場内の配列を流れるようにして移行されることも可能である。また

、細胞は、重力場により移動するように細胞を励起させることも出来る。これと代替的に、電界を発生させて細胞の移動を励起させるため、磁気小球を装置に取り付けることも出来る。更に、光学式ピンセットと呼ばれる集束した光ビームを使用して、細胞を配列を通じて動かすことも出来る。また、細胞を励起させて移行させる上記及びその他の手段も本発明の範囲に属し、本明細書で使用する「電界又は同様の力の場」という表現は、「同様の力の場」に含まれるものとする。

本発明の範囲内の一実施例の一例として、該装置は、血液細胞が身体を通ることを要する開口部に似た受容器 24 内に配置された通路手段を備えることにより、人体内の毛管を模擬する設計とすることが出来る。化学的環境、通路の開口及び局部的形態及び流速を精密に制御し且つ薄膜物理学の理論を適用することにより、

細胞が複雑な環境を通る状態、細胞の老化及び細胞溶液の化学的環境が薄膜の性質を支配するかを理解することが可能となる。

上記の実施例は、全ての点で単に一例にしか過ぎず、限定的なものではないと解釈すべきである。

【 図 1 】

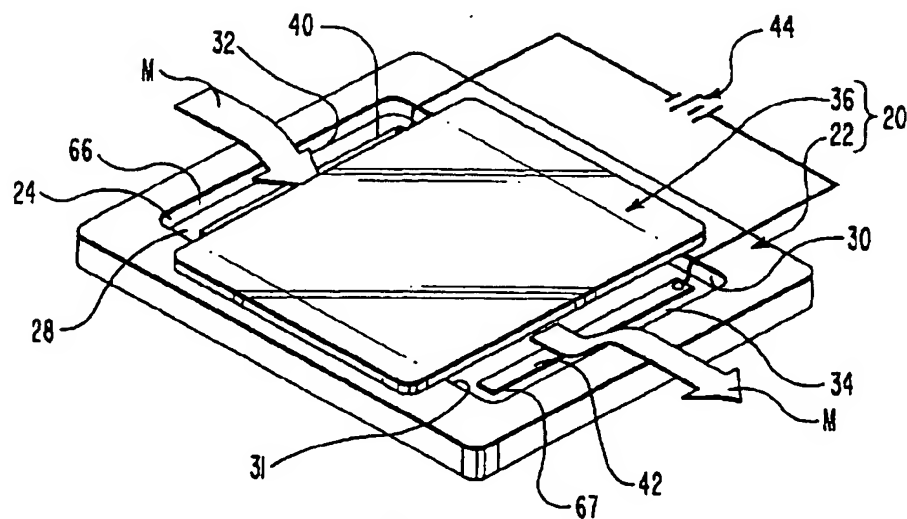
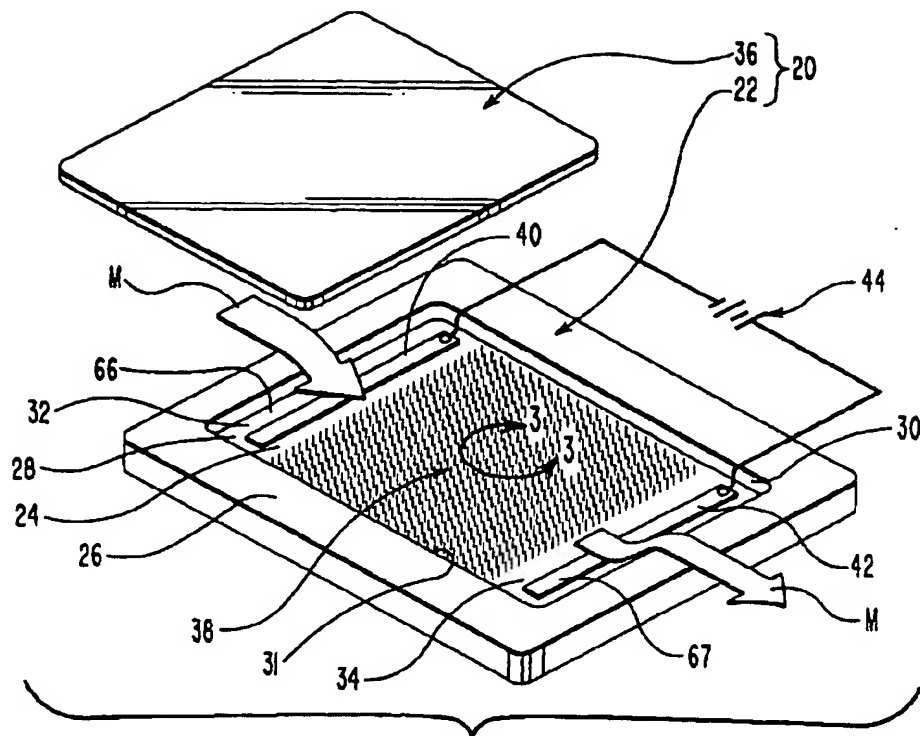
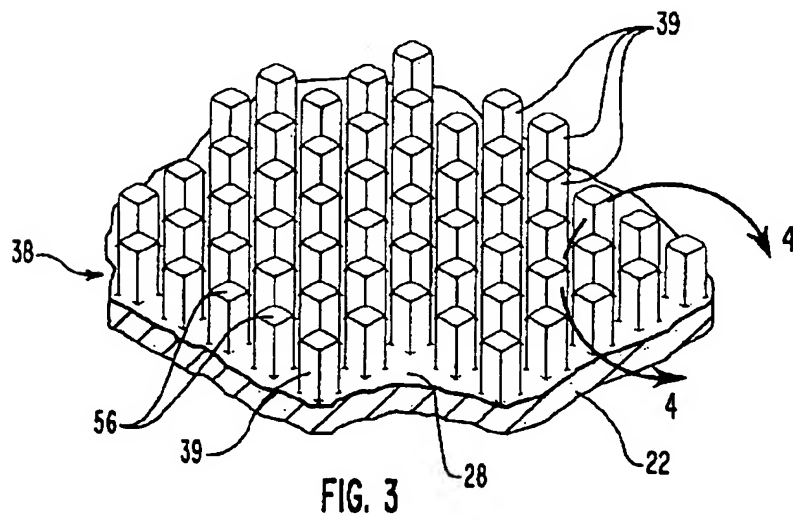


FIG. 1

【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

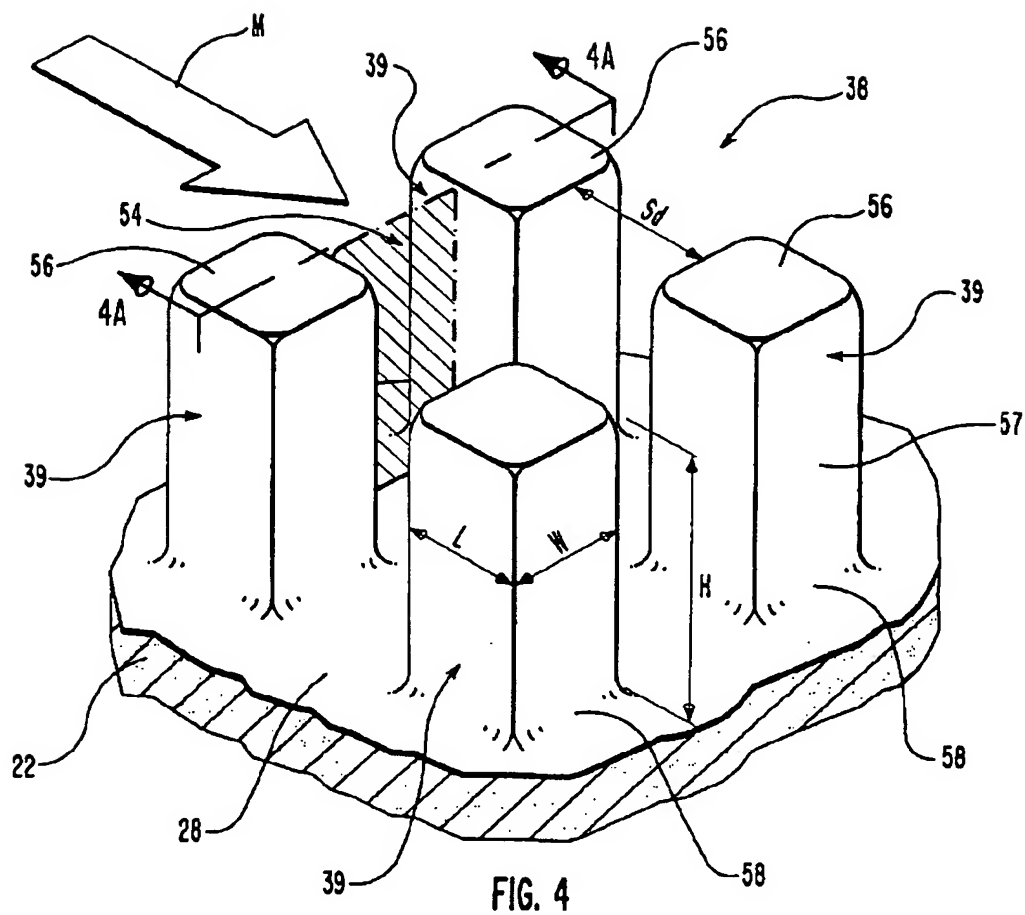
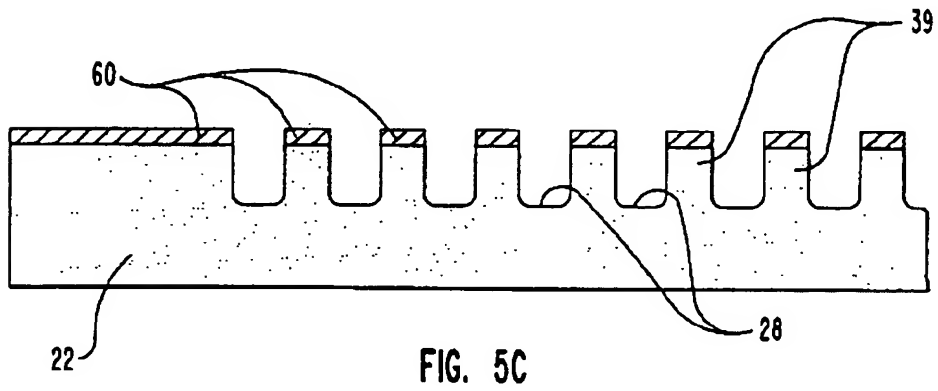
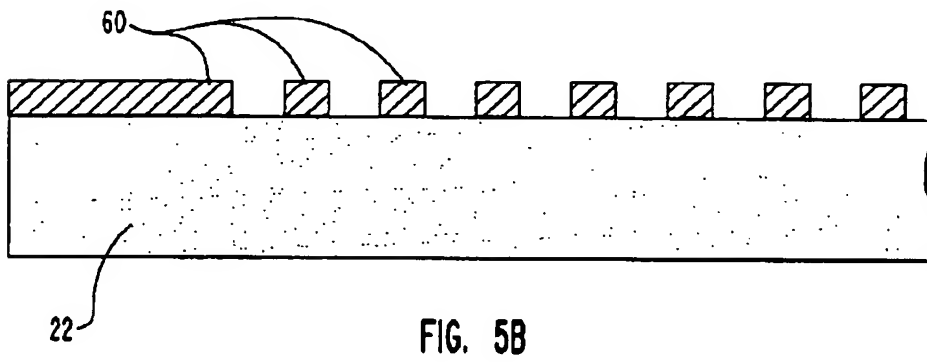
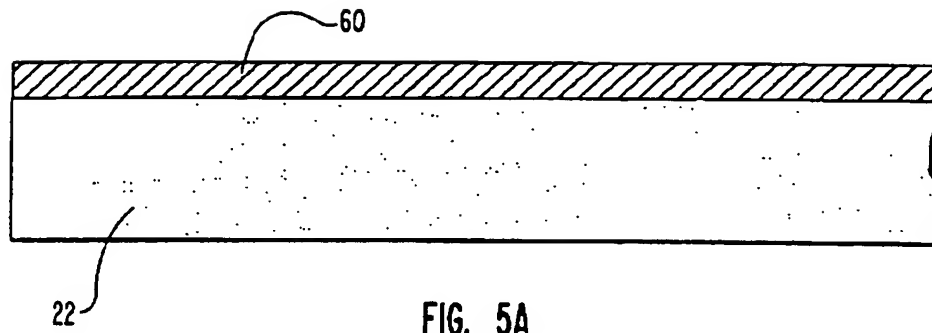




FIG. 4A

【 図 5 】



【 图 5 】

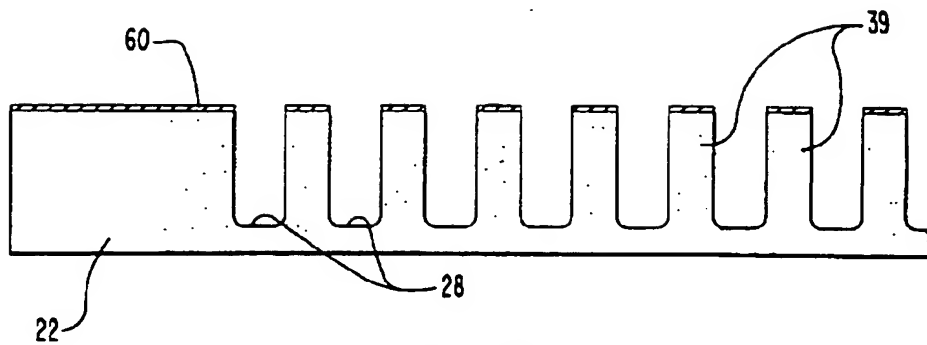


FIG. 5D

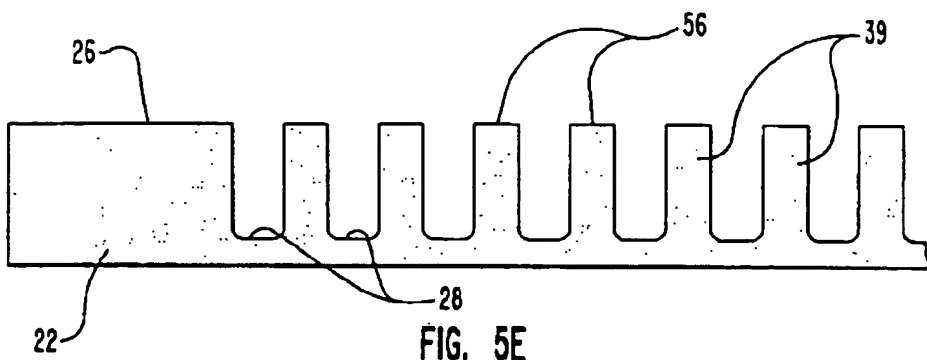


FIG. 5E

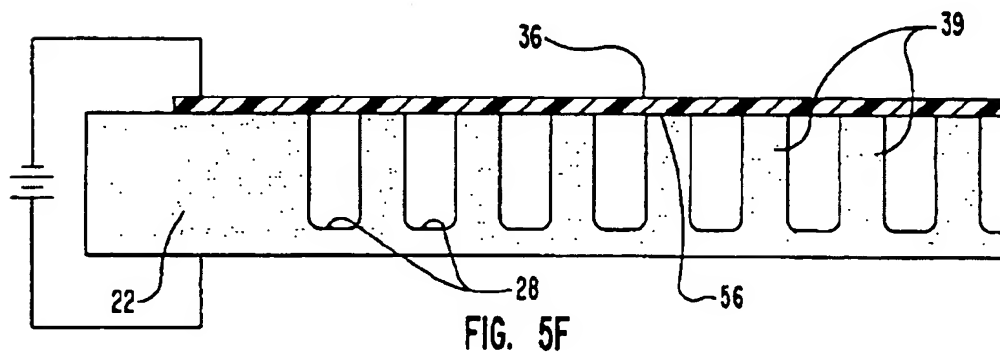
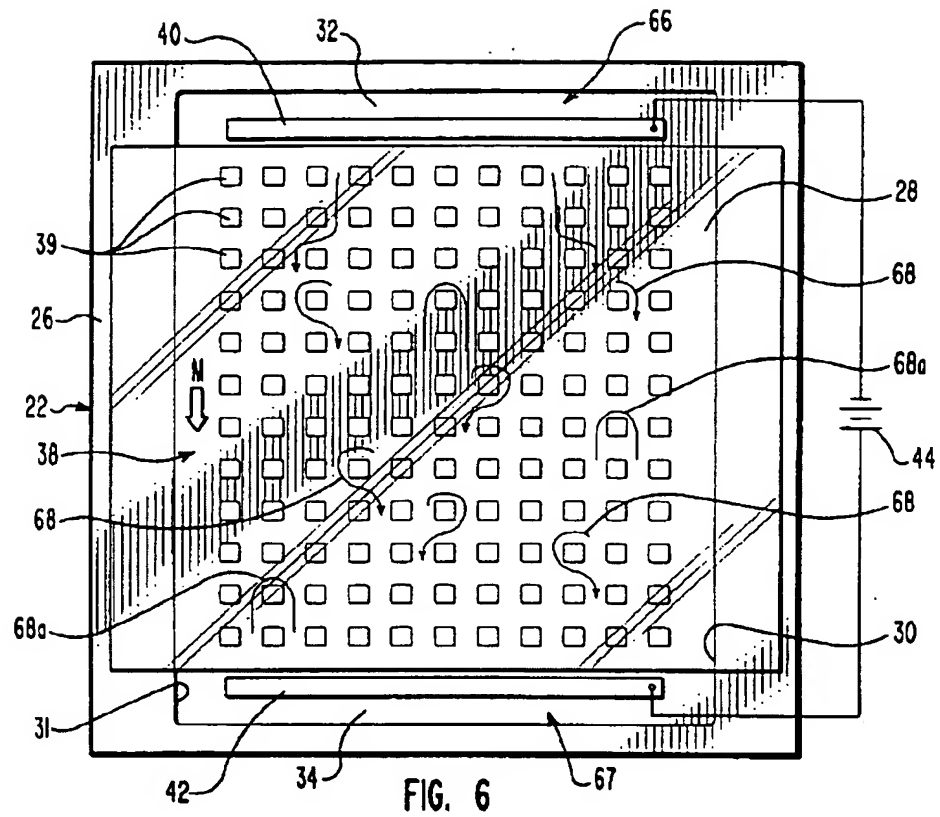


FIG. 5F

【 図 6 】



【 図 7 】

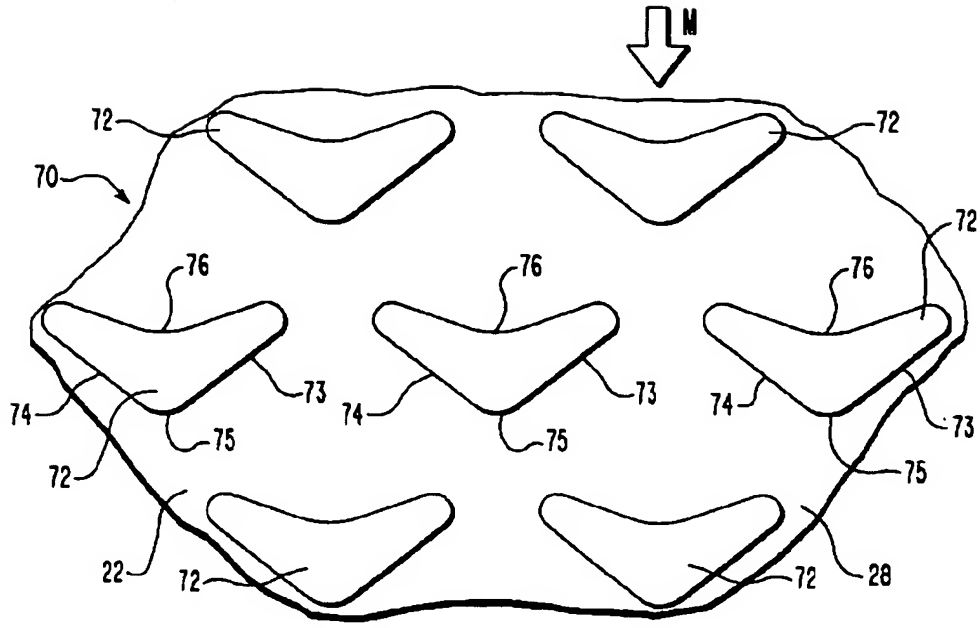


FIG. 7

【 図 8 】

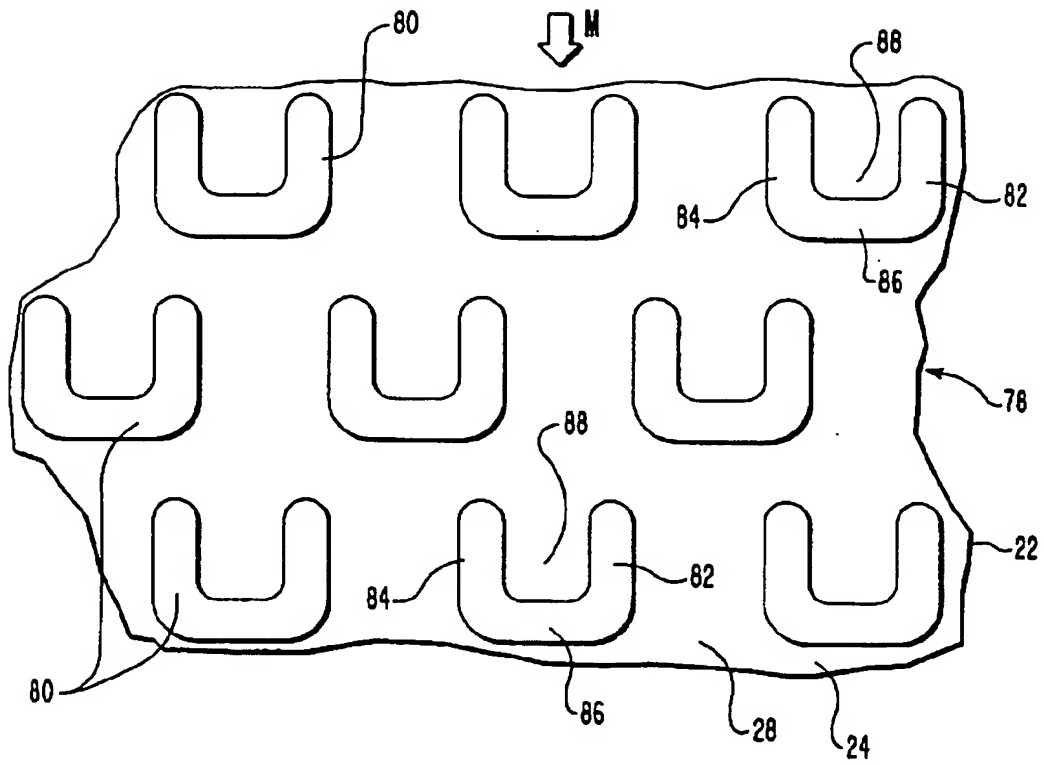


FIG. 8

【 図 9 】

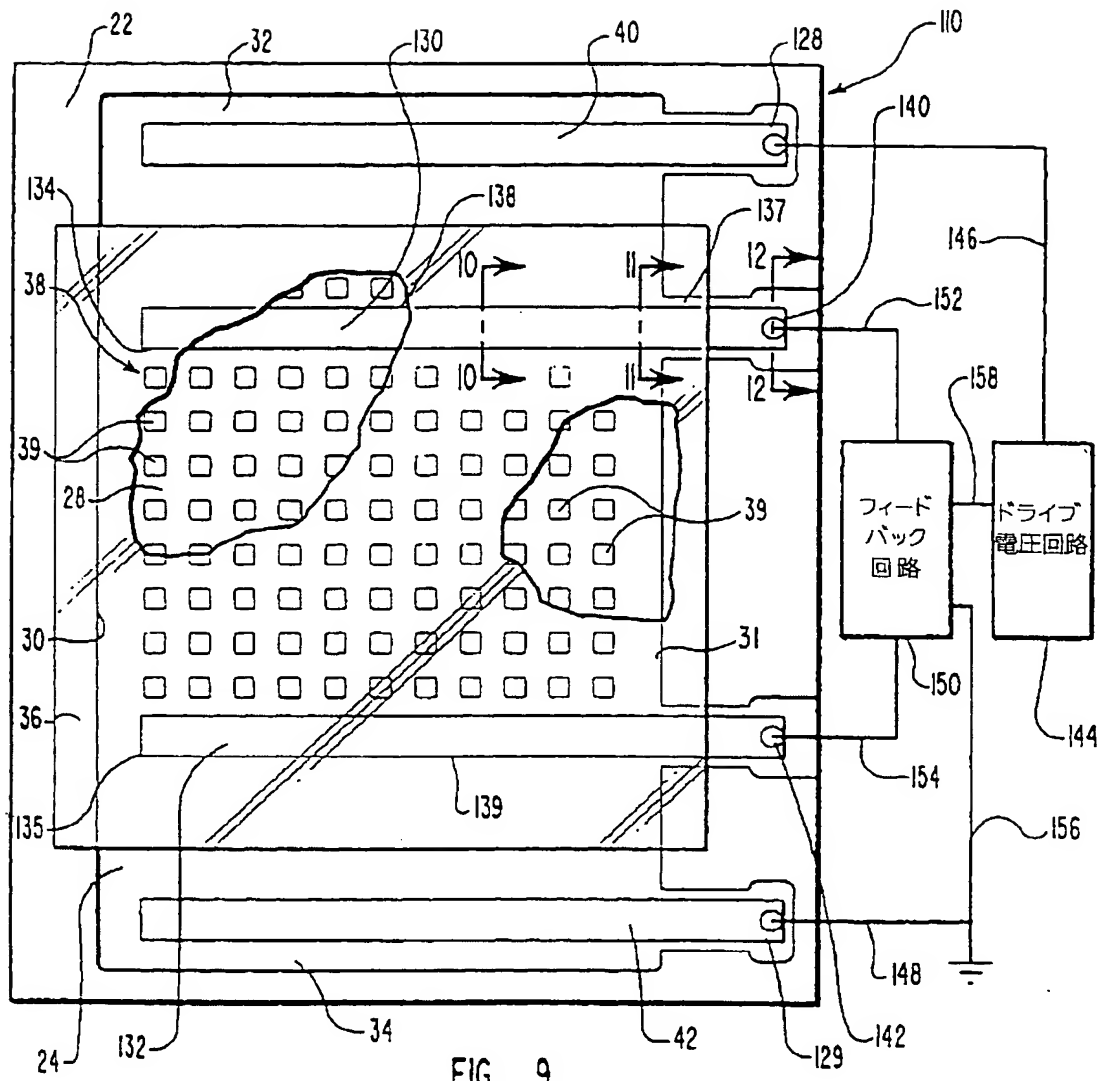


FIG. 9

【 図 10 】

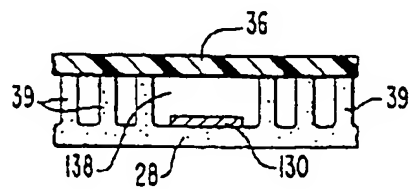


FIG. 10

【 図 1 1 】

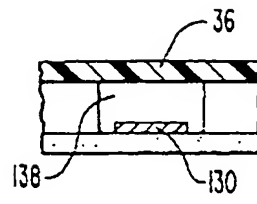


FIG. 11

【 図 1 2 】

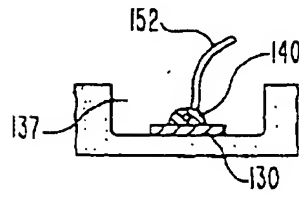


FIG. 12



【 図 1 3 】

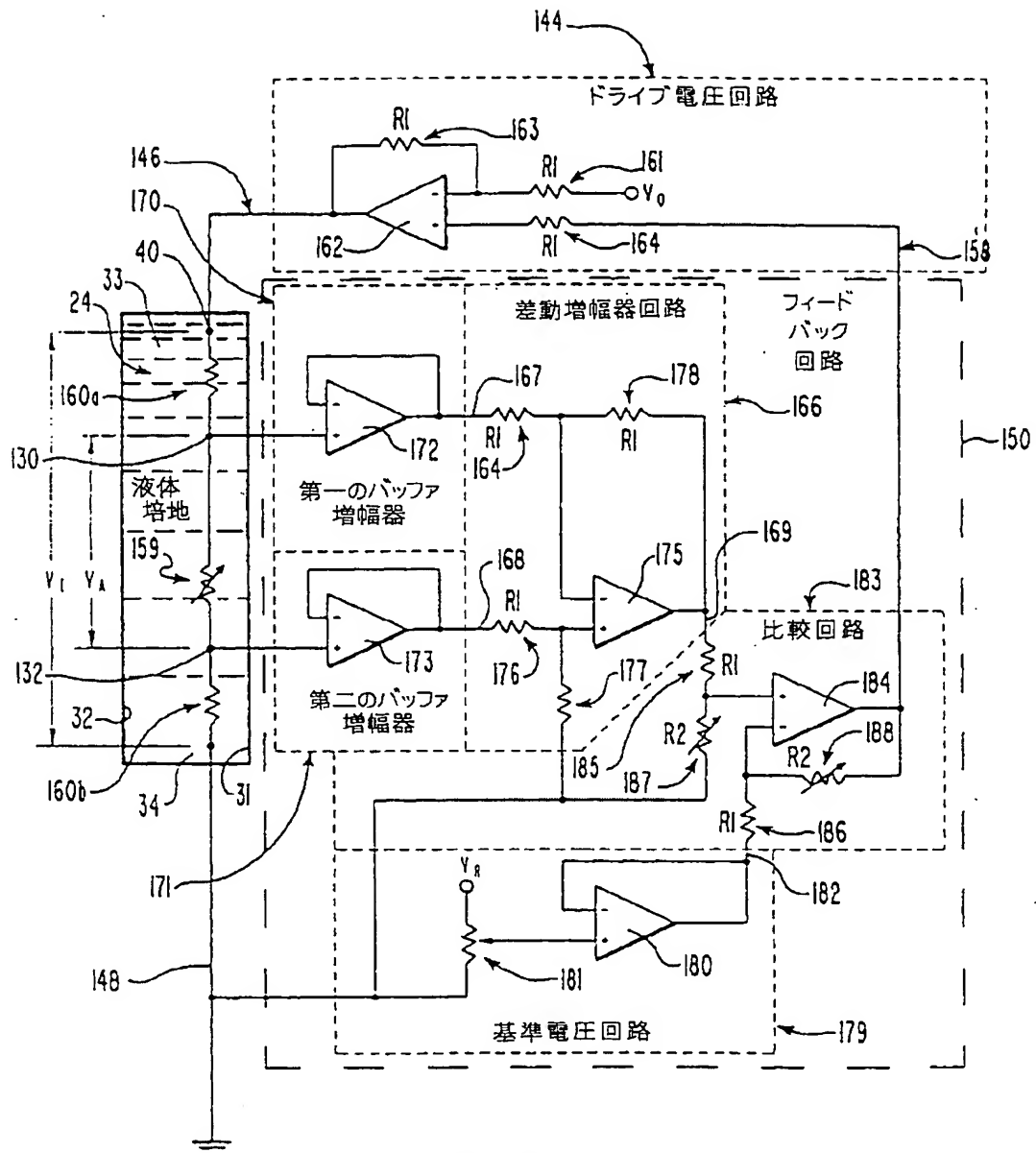


FIG. 13

【 図 1 4 】

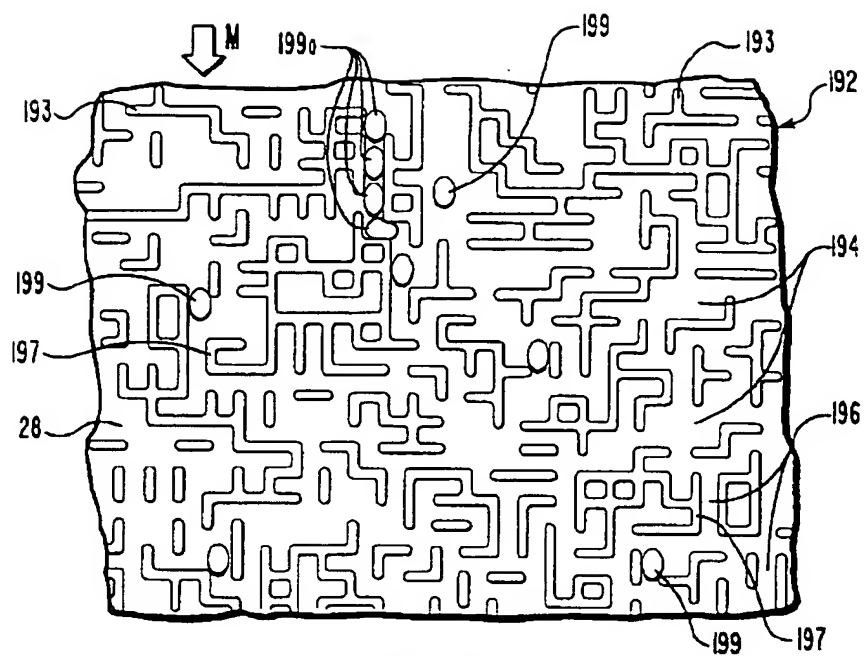
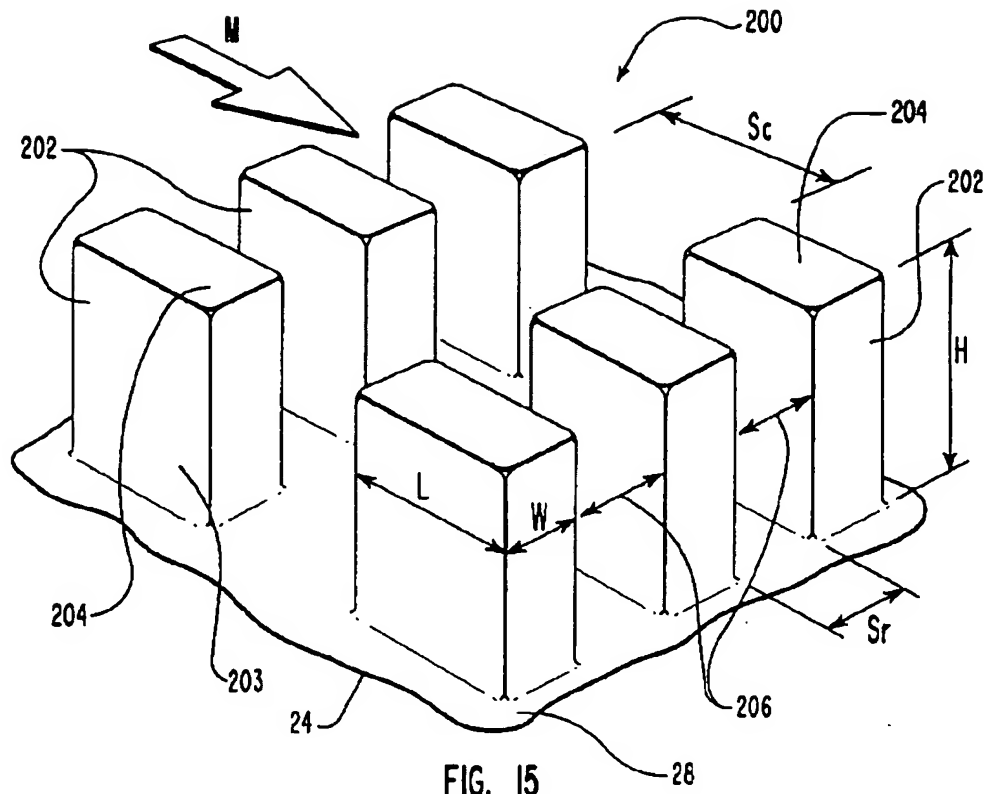


FIG. 14

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

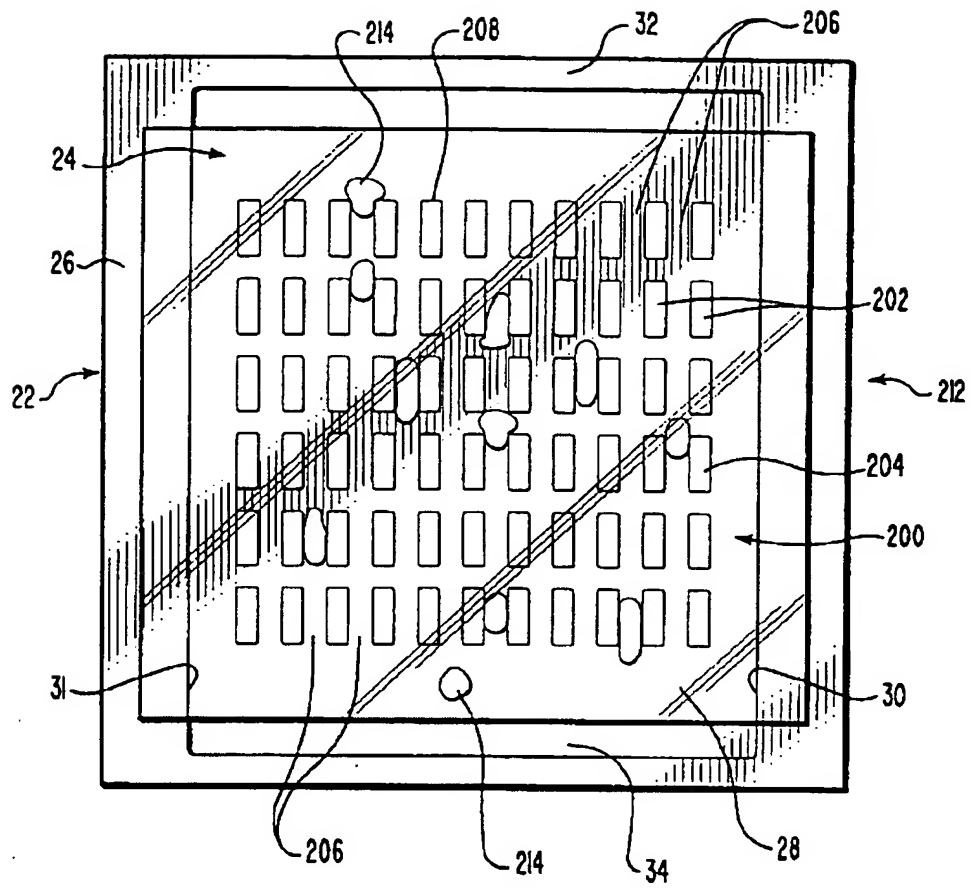


FIG. 16

【 図 1 7 】

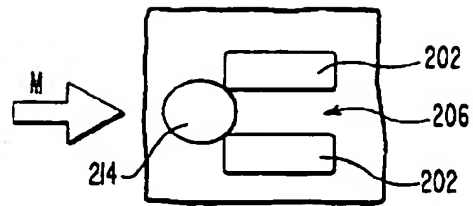


FIG. 17A

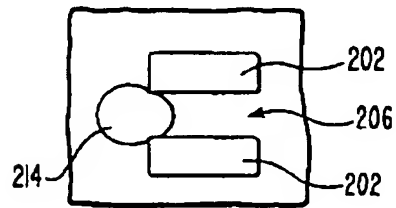


FIG. 17B

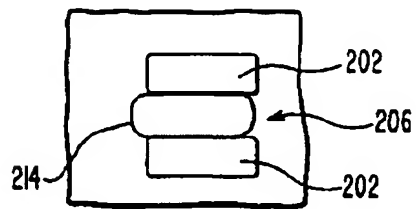


FIG. 17C

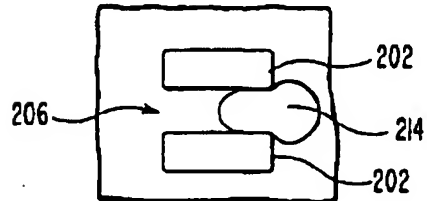


FIG. 17D

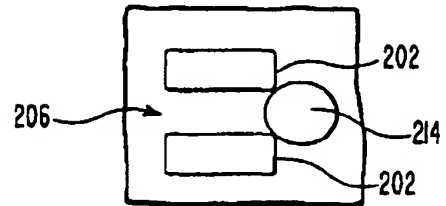


FIG. 17E

【 図 1 8 】

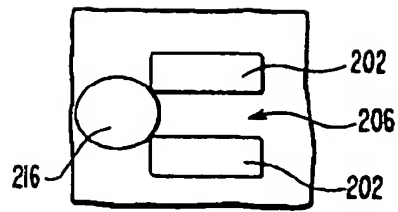


FIG. 18A

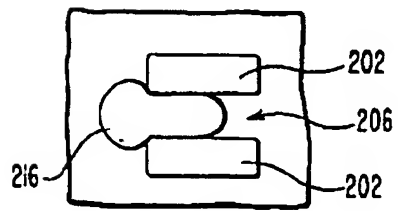
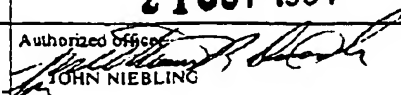


FIG. 18B

## 【 国 際 調 査 報 告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/06215

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(5) : G01N 27/26, 447; C12M 1/42 US CL : 204/299R, 180.1; 435/287 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 204/182.8, 299R, 180.1; 435/287 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nature (12 August 1992) W.D. Volkmuth & R.H. Austin "DNA electrophoresis in microlithographic arrays" pp600-602. See entire document.	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 SEPTEMBER 1994		Date of mailing of the international search report 21 OCT 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3330		Authorized Officer  JOHN NIEBLING Telephone No. (703) 305-3325

---

フロントページの続き

(72)発明者 ラスバン, リン・チャールズ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州14850, イ  
サカ, ガンダーマン・ロード 79, コーネ  
ル・リサーチ・ファンデーション・インコ  
ーポレーテッド内

【要約の続き】  
囲に含まれる。



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

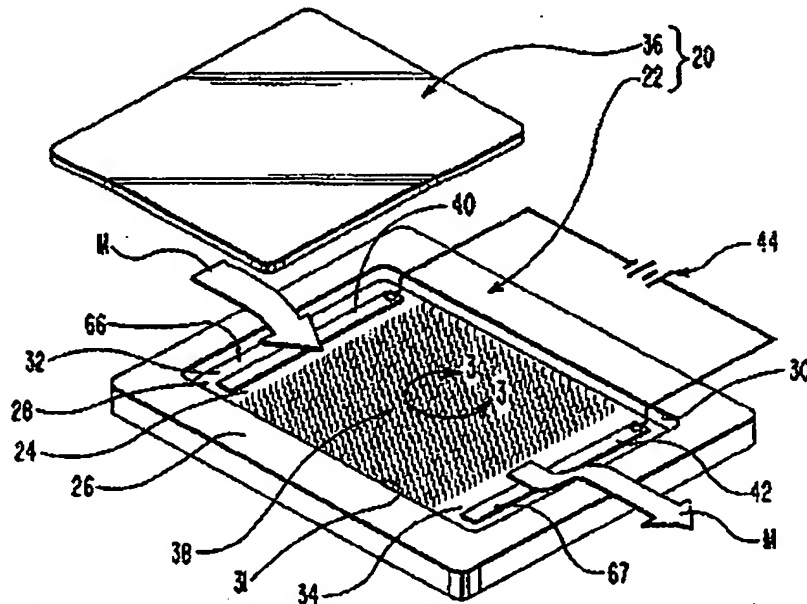
## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 5: G01N 27/26, 27/447, C12M 1/42	A1	(11) International Publication Number: WO 94/29707 (43) International Publication Date: 22 December 1994 (22.12.94)
(21) International Application Number: PCT/US94/06215 (22) International Filing Date: 3 June 1994 (03.06.94)	(31) Designated States: CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
(30) Priority Data: 08/074,432 8 June 1993 (08.06.93) US	Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.	
(71) Applicant: BRITISH TECHNOLOGY GROUP USA INC. [US/US]; 2200 Renaissance Boulevard, Gulph Mills, PA 19406 (US).		
(74) Agent: SPIVAK, Joel, P.; British Technology Group USA Inc., 2200 Renaissance Boulevard, Gulph Mills, PA 19406 (US).		

(54) Title: MICROLITHOGRAPHIC ARRAY FOR MACROMOLECULE AND CELL FRACTIONATION

## (57) Abstract

A sorting apparatus and method for fractionating and simultaneously viewing individual microstructures, such as free cells, viruses, macromolecules, or minute particles in a fluid medium. The sorting apparatus (20) is composed of a substrate (22) having a receptacle (24) located therein, the receptacle (24) having sidewalls (30, 31) and a floor (28). An array of obstacles (38) is positioned within the receptacle (24). A transparent cover (36) overlies the array of obstacles (38) to cover the receptacle and afford visual observation of the obstacles. Electrodes (40, 42) may be positioned within the receptacle (24) to generate an electric field in the fluid medium in the receptacle in order to induce the migration of the microstructures. Migration of the microstructures may also occur, for example, by hydrodynamic field, an optical field, a magnetic field, a gravity field applied to the receptacle. The obstacle of the array of obstacles may be of various shapes such as round posts, rectangular bunkers, or v-shaped or cup-shaped structures. The arrays of obstacles are formed of a predetermined and reproducible pattern, and can be reused. Methods for manufacturing and using the apparatus are also claimed.



BEST AVAILABLE COPY

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**